

**Geschlechterunterschiede bei drucklast- induzierter Myokardhypertrophie
im Mausmodell
- Einfluss von Östrogenrezeptor β -**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie
eingereicht an der**

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

**Dipl. Biol. Daniela Fliegner (geb. Schulz)
Geboren am 06.04.1976 in Berlin**

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches
Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter/innen: **1. Prof. Lockau**
 2. Prof. Regitz-Zagrosek
 3. Prof. Grohé

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2008

Zusammenfassung

Die Entwicklung und der Verlauf einer linksventrikulären Hypertrophie und Herzinsuffizienz unterscheiden sich deutlich zwischen Frauen und Männern. Diese Geschlechterunterschiede können zumindest partiell auf Sexualhormone, insbesondere Östrogen, zurückgeführt werden. Östrogene wirken biologisch über zwei verschiedene Östrogenrezeptoren: ER α und ER β . Viele Befunde weisen auf eine positiv modulierende Wirkung der Östrogene und speziell auf eine besondere Rolle des ER β bei der Entwicklung der druckinduzierten Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz hin.

Die vorliegende Studie befasst sich mit der Untersuchung der Geschlechterunterschiede in der Ausprägung einer pathologischen Myokardhypertrophie und den myokardialen Veränderungen unter dem Einfluss des Östrogenrezeptors β .

Grundlage der Arbeit bildete ein Mausmodell mit ER $\beta^{-/-}$ - und Wildtyp- Mäusen, denen durch eine transversale Aortenkonstruktion (TAC) eine artifizielle Myokardhypertrophie induziert wurde. Zur Dokumentation der Progression und den damit verbundenen Veränderungen wurden zwei Zeitpunkte gewählt, welche die adaptive und maladaptive kardiale Antwort darstellen. Die Entwicklung der myokardialen Hypertrophie wurde sowohl durch Echokardiographie als auch hämodynamischen Messungen charakterisiert und durch biochemische und molekulare Techniken sowie den Einsatz von Mikroarrays untersucht.

Zwei Wochen nach TAC lag eine konzentrische Hypertrophie vor, die noch keinen Funktionsverlust und keine Geschlechterabhängigkeit aufwies. Nach neun Wochen entwickelten die Tiere eine kardiale Hypertrophie mit Einschränkungen der linksventrikulären Funktion in Systole und Diastole sowie beginnender Dilatation. Die weiblichen WT- Tiere präsentierten dabei eine geringere Hypertrophieentwicklung. Die systolische Funktion und die mitochondriale Aktivität waren besser erhalten als bei den männlichen Tieren. Diese geschlechtsabhängigen Veränderungen könnten über PPAR α und den Glukosetransporter GLUT1 vermittelt werden. Die TAC- Induktion führte darüber hinaus zu unterschiedlichen Ausprägungen der Fibrose zwischen den Gruppen, wobei die weiblichen WT- Tiere die geringste Fibrosierung zeigten. In den weiblichen ER $\beta^{-/-}$ - Tieren nahm die Fibrosierung signifikant zu und war stärker ausgeprägt als in den männlichen ER $\beta^{-/-}$ - Tieren. Zudem zeigten ausschließlich männliche ER $\beta^{-/-}$ - Tiere deutliche apoptotische Signale.

In der vorliegenden Arbeit konnte der Einfluss des Geschlechts auf die Entwicklung der Myokardhypertrophie bei andauernder Druckbelastung nachgewiesen werden. ER β modulierte dabei die kardiale Funktion sowie die molekulare Antwort in hypertrophie-assoziierten Prozessen, wie dem kardialen Metabolismus, der kardialen Fibrose und der

Apoptose in weiblichen und männlichen Tieren. ER β trug in den weiblichen Tieren zum Erhalt des kardialen Energiehaushaltes bei und limitierte dadurch die Entwicklung einer kardialen Fibrose und Apoptose. Ein positiver Einfluss des ER β konnte in auch in den männlichen Tieren beobachtet werden: Ein starker Funktionsverlust des Herzens und apoptotische Prozesse wurden durch ER β verlangsamt oder inhibiert. Der Übergang in die Herzinsuffizienz konnte durch ER β gedrosselt werden.

.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1 Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz	1
1.2 Geschlechterunterschiede (GU) bei kardiovaskulären Erkrankungen	2
1.3 Rolle der Östrogenrezeptoren ER α und ER β für Geschlechterunterschiede bei Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz	4
1.4 Rolle des Myokardstoffwechsels bei Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz	7
1.4.1 Kardialer Metabolismus bei Myokardhypertrophie	9
1.4.2 Regulatoren des myokardialen Metabolismus –PPAR und Kofaktoren	9
1.4.3 Geschlechtsspezifische Aspekte im Myokardstoffwechsel bei Myokardhypertrophie	13
1.5 Strukturelle Veränderungen des Herzens bei Myokardhypertrophie: Remodeling	15
1.5.1 Extrazelluläre Matrix.....	15
1.5.2 Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren	16
1.5.3 Geschlechtsspezifische Aspekte im Umbau der extrazellulären Matrix bei Myokardhypertrophie	17
1.6 Apoptose bei Myokardhypertrophie	18
1.7 Globale Genexpressionsanalyse: Mikroarray- Technologie.....	19
1.8 Ziele und Fragestellung.....	20
2. Material	21
2.1 Tiere	21
2.2 Chemikalien und Fertigreagenzien	21
2.3 Puffer und Lösungen.....	23
2.4 Oligonukleotide (Primer)	25
2.5 Antikörper.....	26
2.6 OP-Zubehör	27
2.7 Sonstiges	27
2.8 Geräte	28
2.9 Software	29
3. Methoden	30
3.1 Tierexperimentelle Methoden.....	30
3.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung	30
3.1.2 Mäusestämme.....	30
3.1.3 Genotypisierung	30
3.1.4 Ermittlung der Genotypen	31
3.1.5 Studiendesign	31
3.1.6 Induktion der Hypertrophie durch Transversale Aortenkonstriktion (TAC).....	33
3.1.7 Schein OP (Sham)	35
3.1.8 Echokardiographie	35
3.1.9 Hämodynamische Messungen.....	40
3.1.10 Organentnahme	43
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	44
3.2.1 Isolierung der RNA aus Myokardgewebe.....	44
3.2.2 Überprüfung der RNA-Qualität.....	45
3.2.3 Reverse Transkription	45
3.2.4 Quantitative Real Time-PCR.....	46

3.2.5	Quantifizierung der Real-Time- PCR	47
3.3	Mikroarray-Technologie	48
3.3.1	Array-Format	48
3.3.2	Komplexe Hybridisierungen mit Affymetrix GeneChip Mikroarrays.....	49
3.3.3	Bildauswertung der Mikroarrays.....	50
3.3.4	Differentielle Genexpression	50
3.3.5	ANOVA Test.....	52
3.3.6	Funktionelle Annotation von Gen-Gruppen mit DAVID, GO und KEGG	52
3.3.7	Standardisierung und Veröffentlichung von Array-Datensätzen	52
3.4	Biochemische Methoden.....	53
3.4.1	Proteinisolierung und Proteinbestimmung	53
3.4.2	SDS-Page	54
3.4.3	Western Blot (Tank-Blot-System).....	54
3.4.4	Antikörper Hybridisierung	54
3.4.5	Detektion	55
	Stripping- Protokoll.....	55
3.4.6	Western Blot Auswertung.....	55
3.5	Histologie	56
3.5.1	Paraffineinbettung	56
3.5.2	Sirius-Rot-Färbung.....	56
3.5.3	Bestimmung des Gesamtkollagengehalts der histochemischen Präparate	56
3.5.4	TUNEL-Assay	58
3.6	Statistik.....	58
4.	Ergebnisse	59
4.1	Geschlechterunterschiede in der Morphologie bei drucklast- induzierter Myokardhypertrophie	60
4.1.1	Hypertrophieentwicklung.....	60
4.1.2	Geschlechtsspezifische Zunahme der morphologischen Hypertrophiemarker	61
4.2	Geschlechterunterschiede in der Funktion bei drucklast- induzierter Myokardhypertrophie	64
4.2.1	Echokardiografische Analyse der systolischen Funktion bei Myokardhypertrophie	64
4.2.2	Zeitlicher Verlauf der EF: Verlust der systolischen Funktion nach vier Wochen	65
4.2.3	Die konzentrische Hypertrophie ist die dominierende Hypertrophieform- Übergang zur Dilatation?	66
4.2.4	Hämodynamische Charakterisierung: Beurteilung der Herzfunktion bei Myokardhypertrophie	67
	Zusammenfassung zur Charakterisierung der kardialen Funktion.....	70
4.2.5	Molekulare Hypertrophiemarker	71
4.2.6	Korrelation morphologischer und molekularer Hypertrophiemarker.....	74
4.2.7	ER α - Genexpression unbeeinflusst von ER β - Deletion	74
4.3	Geschlechterunterschiede in der globalen Genexpression.....	75
4.3.1	Regulation der typischen Hypertrophiemarker	79
4.3.2	Differentielle Genexpression zwischen männlichen und weiblichen Tieren....	79

4.3.3	Geschlechtsspezifische Regulation biologischer Prozesse bei Myokardhypertrophie	80
	Zusammenfassende Resultate der Mikroarray- Analyse	85
4.4	Geschlechtsspezifische Mechanismen bei Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz: Regulation des myokardialen Stoffwechsels	85
4.4.1	Verminderte PPAR α - Proteinexpression bei Myokardhypertrophie	86
4.4.2	Reduktion der PPAR β/δ - Proteinexpression in kardialer Hypertrophie	86
4.4.3	Geschlechterunterschiede in der PPAR γ - Proteinexpression	87
4.4.4	Geschlechterunterschiede in PGC1- α - Proteinexpression und Genexpression	88
4.4.5	Verminderte Genexpression der PPAR- Zielgene	90
4.4.6	Einfluss von Geschlecht und Genotyp auf den Glukosestoffwechsel	91
	Zusammenfassung zur Untersuchung der Regulation des kardialen Stoffwechsels in der Hypertrophieentwicklung.....	92
4.4.7	Geschlechterunterschiede in der Fibroseentwicklung.....	94
4.4.8	Anstieg der Kollagenexpression bei Myokardhypertrophie	98
4.4.9	Veränderte Genexpression der Matrixmetalloproteinasen.....	99
4.4.10	Gesteigerte Expression der Matrixmetalloproteinasen Inhibitoren.....	100
	Zusammenfassung zur Untersuchung des kardialen Remodeling bei Myokardhypertrophie und der Progression in die Herzinsuffizienz	102
4.5	Geschlechtsspezifische Prozesse bei Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz: Apoptose.....	102
5.	Diskussion	106
5.1	Geschlechterunterschiede in der Morphologie und Funktion bei Myokardhypertrophie und der Progression in die Herzinsuffizienz	106
5.1.1	Geschlechterunterschiede in der späten Phase der Myokardhypertrophie: Morphologie und Funktion.....	107
5.1.2	Östrogenrezeptor β moduliert die kardiale Antwort bei induzierter Drucklast geschlechtsspezifisch	108
5.2	Geschlechterunterschiede in der globalen Genexpression.....	110
5.3	Einfluss des Östrogenrezeptors β auf die globale Genexpression	112
5.4	Geschlechterunterschiede im kardialen Stoffwechsel bei Myokardhypertrophie	113
5.5	Geschlechterunterschiede in der Fibroseentwicklung.....	115
5.6	Geschlechterunterschiede in der Apoptose	119
5.7	Fazit	119
5.8	Limitationen	120
6.	Ausblick	122
	Literaturverzeichnis	124
	Danksagungen	148
	Selbständigkeitserklärung	149

Abkürzungsverzeichnis

AA/BAA	Acrylamid/Bisacrylamid
ACOX	Acetyl-CoA-Oxidase
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaar
BR	Block Reagenz
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad in Celsius
cDNA	Komplementäre DNA
CD36	Cluster of Differentiation 36
CPT1	Carnityl-Palmitoyl-Transferase
DAPI	Diamidino-2-phenylindol dihydrochlorid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E2	Östradiol
ER α	Östrogenrezeptor α
ER β	Östrogenrezeptor β
ER $\beta^{-/-}$	Östrogenrezeptor- β -defizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF%	Ejektionsfraktion in Prozent
EtBr	Ethidiumbromid
g-Zahl	Zentrifugationsbeschleunigung
GLUT1/4	Glukosetransporter 1/4
HE	Hämatoxylin/ Eosin
HG	Herzgewicht
HG/KW	Herzgewicht/Körpergewicht
HG/TL	Herzgewicht/Tibia-Länge
HF	Herzfrequenz
kDa	Kilo Dalton

KG	Körpergewicht
LV	linker Ventrikel
mg	Milligramm
MCAD	Medium Chain Acetyl Dehydrogenase
MI	Myokardinfarkt
ml	Milliliter
mRNA	messenger (Boten) RNA
µg	Mikrometer
µl	Mikroliter
min	Minute
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PPAR	Peroxisomen Proliferierender Aktivierter Rezeptor
PGC-1α	PPARγ-Ko-Aktivator
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sham	Scheinoperiert
T	Tween 20
TAC	Transversale Aortenkonstriktion
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht
WT	Wildtyp (homozygot)

1. Einleitung

1.1 Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz

Eine Vielzahl kardiovaskulärer Krankheiten geht mit der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie, der pathologischen Vergrößerung des Herzens, einher.

In klinischen Studien wurde die kardiale Hypertrophie als unabhängiger Risikofaktor für Ischämien, Arrhythmien und plötzlichen Tod erkannt [1]. Myokardhypertrophie entsteht häufig als Folge einer Druckbelastung, wie zum Beispiel durch Bluthochdruck und Aortenstenose. Dabei wird eine Zunahme der Wanddicke des Herzens mit erhaltener Funktion beobachtet. Man spricht von einer konzentrischen (adaptiven) Hypertrophie. Wird die Druckbelastung nicht verringert, entwickelt sich diese konzentrische Hypertrophie in eine exzentrische (maladaptive) Hypertrophie, die häufig mit einer Herzinsuffizienz einhergeht (Abbildung 1.1). Deren Merkmale sind eine Dilatation und ein starker Kontraktilitätsverlust des linken Ventrikels [2].

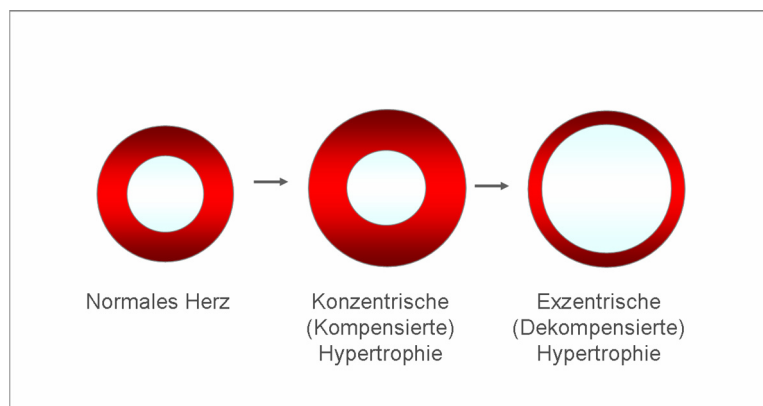


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Hypertrophieformen.

Die Myokardhypertrophie (MH) ist mit einer erhöhten Häufigkeit nachteiliger kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert. Charakteristischerweise lassen sich Veränderungen im kardialen Metabolismus und Umbauprozesse auf struktureller und mechanischer Ebene in den Kardiomyozyten beobachten [3]. Pathologische Stimuli, wie Myokardinfarkt (MI) oder chronischer Sauerstoffmangel, führen zu oxidativem Stress und der Bildung freier Radikale, die den kardialen Metabolismus beeinflussen [4]. Es kommt zu Stoffwechselveränderungen, die mit einem Substratwechsel einhergehen. Dabei findet eine Verschiebung von der Fettsäureoxidation zur Glukoseutilisation statt.

Die Entwicklung der Herzinsuffizienz wird von makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen der Herzstruktur begleitet. Prozesse, wie die kardiale Fibrose, Apoptose

und Angiogenese, begleiten die Herzinsuffizienz. Häufig wird die konzentrische Myokardhypertrophie als adaptiver Mechanismus zur Kompensation eines chronischen Anstiegs der Arbeitslast des Herzens angesehen. Langfristig kann es jedoch zur Fibrosierung des Herzmuskels und einer maladaptiven (exzentrischen) Hypertrophie kommen, aus der sich in Folge die Herzinsuffizienz entwickelt [5,6]. Insgesamt werden diese kardialen Umbauprozesse als „*Remodeling*“ bezeichnet [7].

Die Myokardhypertrophie ist demnach ein bedeutender Vorläufer der Herzinsuffizienz [2,8] und ein wichtiger und unabhängiger negativer Prädiktor kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität [9,10].

1.2 Geschlechterunterschiede (GU) bei kardiovaskulären Erkrankungen

Kardiovaskuläre Erkrankungen betreffen Frauen und Männer auf unterschiedliche Weise. Die wesentlichen Unterschiede bestehen im Erscheinungsalter, der Manifestation der Krankheit sowie in der Prävalenz von Komorbiditäten und der Überlebensrate [11,12,13]. Männer unter 50 Jahren besitzen ein höheres Risiko, an kardiovaskulären Erkrankungen zu erkranken, als gleichaltrige Frauen. Generell entwickeln Frauen eine Herzerkrankung 10- 20 Jahre später als Männer. Tritt diese jedoch in früheren Jahren auf (unter 40-50 Jahren), so ist die klinische Prognose für Frauen schlechter [14].

Ergebnisse aus zwei klinischen Studien, dem *EuroHeart Failure survey programme* und der *Framingheart study*, deuten darauf hin, dass Ätiologie, Pathophysiologie und Symptomatik in der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie bei Männern und Frauen unterschiedlich sind (Cleland et al., 2003, Fox et al., 2005)[15,16,17]. Ferner konnten Carroll et al. zeigen, dass Frauen im Vergleich zu Männern bei gleichen mechanischen Belastungen, wie beispielsweise Druckbelastung durch Aortenstenose, die myokardiale Funktion besser erhalten [18]. Die Herzen weiblicher Patienten mit Aortenklappenstenose sind durch eine andere Form der Hypertrophie charakterisiert als die Herzen männlicher Patienten [18,19]. Frauen neigen dazu, eine konzentrische Hypertrophie mit guter linksventrikulärer Funktion und erhaltener linksventrikulärer Auswurfleistung (Ejektionsfraktion: EF), aber diastolischer Dysfunktion zu entwickeln. Männer hingegen tendieren zur dilatativen Myokardhypertrophie mit eingeschränkter systolischer Pumpleistung [20]. Somit ist die Herzinsuffizienz bei Frauen häufiger durch eine isolierte oder dominierende diastolische Dysfunktion charakterisiert [17,20,21,22]. Bei Auftreten einer systolischen Herzinsuffizienz finden sich im klinischen Verlauf geschlechtsspezifische Unterschiede [21,22,23,24,25]26]. Die Prognose der Herzinsuffizienz ist jedoch für beide Geschlechter ungünstig.

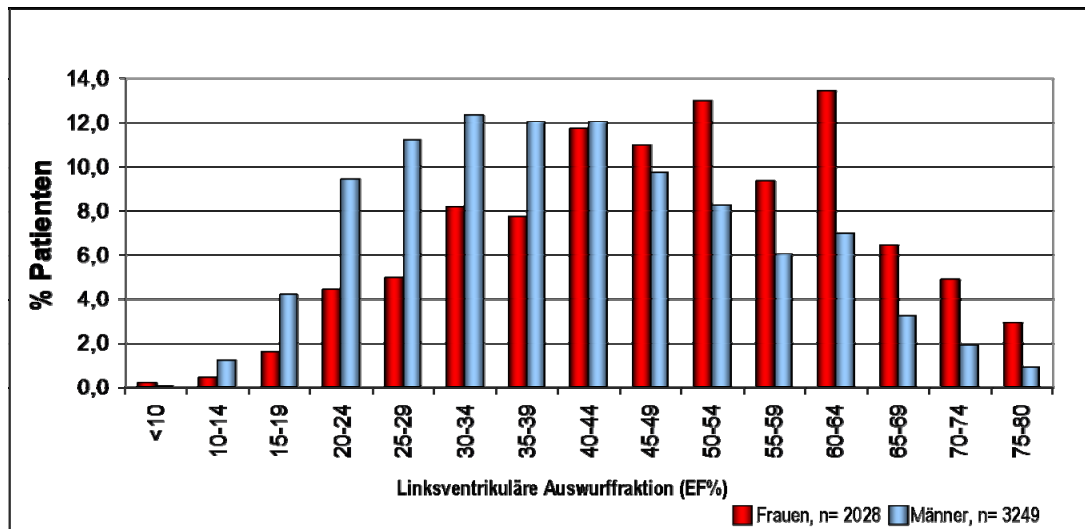


Abbildung 1.2: Die prozentuale Verteilung der systolischen linksventrikulären Auswurfraction EF. Eine verminderte Auswurfraction zeigt eine systolische Dysfunktion an. 51% der männlichen Patienten und nur 28% der weiblichen Patienten weisen eine EF von $\leq 40\%$ auf. Damit sind Männer häufiger von einer systolischen Dysfunktion betroffen als Frauen. (modifiziert nach Cleland et.al 2003)

Es ist unklar, warum Frauen mit Herzinsuffizienz länger leben als ebenfalls erkrankte Männer. Zudem ist die Basis für die auftretenden Geschlechterunterschiede in kardiovaskulären Erkrankungen noch unbekannt. Umfassendes Wissen über die Verschiedenartigkeit der notwendigen Diagnose- und Behandlungsverfahren für Frauen und Männer existiert nicht.

Einer der wesentlichen Geschlechterunterschiede liegt in dem geringeren Risiko für Frauen, prämenopausal koronare Herzerkrankungen zu entwickeln. Inzidenz und Schweregrad einer Myokardhypertrophie und anderer kardiovaskulärer Krankheiten steigen jedoch erheblich nach Einsetzen der Menopause [26,27]. In diesem Kontext äußerten unter anderem Hayward et al. und Leinwand et al. die Vermutung, dass Östrogene das kardiovaskuläre System protegieren und dieser Schutz postmenopausal mit sinkendem Östrogenspiegel verloren geht [28,29].

Das Interesse richtete sich auf die potentielle kardioprotektive Wirkung des Östrogens. Diese konnte jedoch in großen randomisierten Studien, wie der *Estrogen/progestin Replacement Study* (HERS- I) und der *Women's Health Initiative Study* (WHI) nicht bestätigt werden [28,30,31]. Im Gegenteil, die HERS- I Studie ergab einen Anstieg der Koronarherzerkrankungen im ersten Jahr und die WHI- Studie musste wegen eines erhöhten Risikos für kardiovaskuläre Erkrankungen abgebrochen werden. Grady et al. beschrieben, dass eine Hormonersatztherapie (HRT) mit Östrogen/Progestin keine Risikominderung der Herz-Kreislauf-Erkrankung verursacht, jedoch das Risiko für andere

Erkrankungen, wie Schlaganfall und Brustkrebs, erhöht [32]. Es bleibt die Frage offen, wie eine geeignete Hormonersatztherapie aussehen wird.

Die oben genannten Studien weisen auf die Komplexität geschlechtsspezifischer biologischer und molekularer Prozesse hin, die noch nicht ausreichend verstanden sind, um geeignete vorsorgende Behandlungsstrategien zu entwickeln. Diese Prozesse könnten durch genetische Unterschiede entstehen, vor allem aber durch Steroidhormone und deren Rezeptoren vermittelt werden. Aus diesem Grund wird die Aufmerksamkeit vor allem auf die Charakterisierung der Signaltransduktionswege, die über Östrogen und die entsprechenden Rezeptoren vermittelt werden, gerichtet.

1.3 Rolle der Östrogenrezeptoren ER α und ER β für Geschlechterunterschiede bei Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz

Man geht davon aus, dass Geschlechterunterschiede im kardiovaskulären System durch Steroidhormone und Steroidhormonrezeptoren, wie Östrogene und die dazugehörigen Rezeptoren, Östrogenrezeptor alpha (ER α) und beta (ER β), vermittelt werden können [33]. Diese Rezeptoren wurden sowohl in humanen Herzen als auch in Herzen von Nagetieren nachgewiesen [34,35,36,37]. Die Expression von Steroidhormon- Rezeptoren wird durch kardiovaskuläre Erkrankungen beeinflusst. So zeigten Nordmeyer und Mahmoodzadeh et al., dass die Expression von ER α und ER β in Patienten mit Aortenstenose und dilatativer Kardiomyopathie (DCM) signifikant ansteigt. Diese Beobachtung unterstützt die potentielle Relevanz von ER α und ER β im Myokard [35,36].

Östrogenrezeptoren gehören der Steroidrezeptorsuperfamilie an [38,39]. Die Struktur der Rezeptoren gliedert sich in Domänen (Abbildung 1.3). Ein typischer nukleärer Rezeptor besteht aus einer variablen NH₂- terminalen Region (A/B), einer konservierten DNA-bindenden Domäne (DBD), einer Region C, einer verbindenden Region D, und einer konservierten E- Region, welche die ligandenbindende Domäne (LBD) enthält. Des Weiteren finden sich Regionen für die transkriptionelle Aktivierung. Die hypervariable AF- Region (in der A/B- Domäne) vieler Rezeptoren beinhaltet eine autonome transkriptionelle Aktivierungsfunktion. Die als AF- 1 bezeichnete Region bewirkt die ligandenunabhängige Aktivierung des Rezeptors. AF- 2, eine zweite transkriptionelle, ligandenabhängige Aktivierungsdomäne, ist in der LBD- Region lokalisiert. ER α und ER β weisen zum Teil Sequenzhomologien auf. Sie gleichen sich zu 96% in der DBD, zu etwa 53% in der LBD, jedoch nur zu 17,5% in der NH₂- terminalen AB- Domäne [34]. Die Gene für ER α und ER β sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert. Das Gen für ER α liegt auf Chromosom 6q25.1 [40], das Gen für ER β auf Chromosom 14q23.2 [41,42].

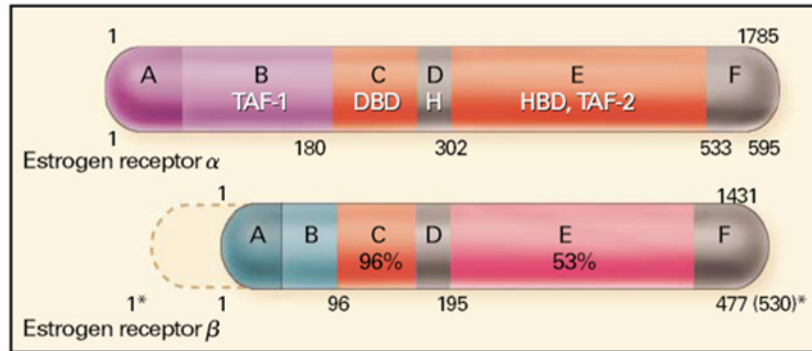


Abbildung 1.3: Struktur der humanen Östrogenrezeptoren ER α und ER β nach Mendelsohn M. et.al[34]. Die N-terminale AB-Domäne trägt die ligandenunabhängige Transaktivierungsfunktion (TAF-1). Sie ist in beiden Rezeptoren sehr unterschiedlich strukturiert. Die C-Domäne ist die DNA-bindende Domäne (DBD), sie enthält die beiden Zinkfinger, die an der Rezeptor-Dimerisierung und anschließenden Bindung des Rezeptor-Komplexes an die DNS beteiligt sind. Diese Domäne ist in allen Steroidrezeptoren stark konserviert. Die D-Domäne ist die Hinge (H) Region. Domäne E enthält die hormonbindende Domäne (HBD) und die hormonabhängige Transaktivierungsfunktion (TAF-2). Domäne F ist die variable Region, in der die Sequenz für die Helix 12 enthalten ist. Diese vermittelt die unterschiedliche Antwort der Östrogenrezeptoren auf das Östrogen und den selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) [43].

Die Östrogenrezeptoren fungieren als Transkriptionsfaktoren und können bei Aktivierung durch einen Liganden die Expression einer Vielzahl von Genen, die ein *Estrogen response element* (ERE) tragen [44], modulieren [45,46,47]. Beide Rezeptoren haben die gleiche Affinität zu 17 β - Estradiol (E₂). Bei Aktivierung bilden sie Homo- oder Heterodimere und regulieren je nach Art der Dimerisierung unterschiedliche Gene [47]. Zudem sind ER α und ER β in der Lage, die Funktion anderer Transkriptionsfaktoren durch Protein- Protein- Interaktionen im Nukleus zu verändern oder spezielle Signaltransduktionswege zu aktivieren, die wiederum die Aktivität der Ziel-Transkriptionsfaktoren modulieren [33,48].

Östrogen kann via ER α und ER β einen direkten oder indirekten Effekt auf das kardiovaskuläre System ausüben. Direkte Effekte durch Östrogen können über nicht genomische Signalwege innerhalb von Sekunden und Minuten oder über länger andauernde genomische (indirekte) Signalwege vermittelt werden [49,50]. Ein nicht-genomischer Effekt konnte in isolierten kardialen Myozyten gezeigt werden. Dort bewirkt E₂ über membrangebundene Östrogenrezeptoren einen schnellen Abfall des Kalziumausstoßes über L- Typ Kalziumkanäle [37,51]. Die Östrogenrezeptoren können ebenso von Wachstumsfaktoren in Abwesenheit von Östrogen aktiviert werden. Der direkte Effekt von Östrogen ist in klassischer Weise die Interaktion mit den intrazellulären Östrogenrezeptoren, die nachfolgend die Expression spezifischer Gene im Nukleus

modifizieren. Abbildung 1.4 zeigt die von Östrogen abhängigen und unabhängigen multiplen Signalwege.

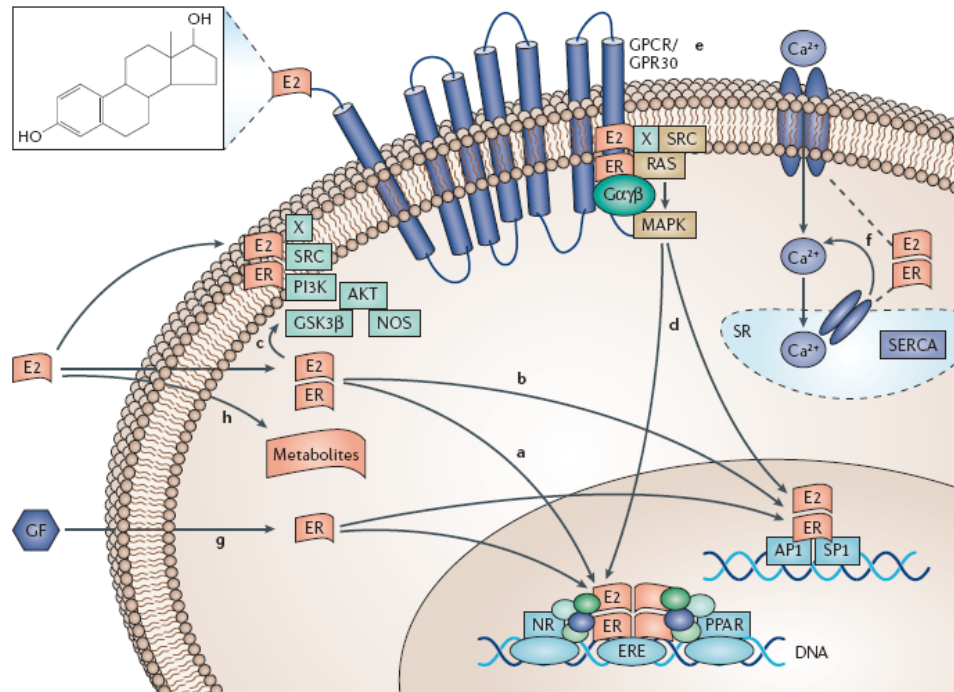


Abbildung 1.4: Multiple Signalwege von Östrogen (E2) in kardialen Zellen (nach V. Regitz-Zagrosek)^[52].

a) Östrogen kann einen im Zytosol befindlichen Östrogenrezeptor aktivieren, transloziert in den Nukleus und initiiert die Gentranskription; b) Östrogen kann membranassoziierte ER aktivieren; c) Die zur Aktivierung der NOS-Signalkaskade und der MAPK-Signalkaskade über ERα führt; e) Der G-gekoppelte Rezeptor GPR30 wird als neuer ER betrachtet und scheint über die MAPK aktiv zu sein; f) Ferner kann Östrogen den Kalziumseinstrom beeinflussen; g) Wachstumsfaktoren können die ER's ligandenunabhängig aktivieren; h) Östrogen kann über Metaboliten, wie Katechol- und Methoxy-Östrogenen wirken.

Eine Vielzahl von experimentellen Studien hat die Rolle von E2 nach myokardialen Infarkt (MI), in Myokardhypertrophie und linksventrikulärem Remodeling untersucht. Viele Befunde deuten auf eine kardioprotektive Rolle von Östrogen hin. Jedoch sind diese Befunde abhängig vom Stimulus, der auf das Myokard ausgeübt wird. Van Eickels et al. zeigten erst kürzlich in einem MI- Mausmodell, dass die Behandlung mit E2 in ovariectomierten weiblichen Mäusen zu einem Anstieg der linksventrikulären Masse, zur Myozytenhypertrophie sowie zu erhöhter Mortalität führte [53]. Die Behandlung mit E2 von Mäusen mit Aortenstenose reduzierte hingegen die linksventrikuläre Hypertrophie [54,55]. Zur Identifikation des beteiligten Östrogenrezeptors wurden Östrogenrezeptor- defiziente Tiere generiert und für experimentelle Studien herangezogen. Es handelt sich um Knock-Out Modelle mit einer Deletion für ERα ($ER\alpha^{-/-}$), für ERβ ($ER\beta^{-/-}$) sowie einem doppelten Knock-Out ($ER\alpha^{-/-}\beta^{-/-}$).

Eine Vielzahl von Studien belegt, dass eine positive modulierende Wirkung von E2 im hypertrophierten und infarzierten Herz vorwiegend über ER β vermittelt wird [56][57],[58]. Es konnte demonstriert werden, dass ER α in tierexperimentellen Studien keinen nachgewiesenen Einfluss auf die Entwicklung der Myokardhypertrophie oder die kardiale Funktion hatte [59][60]. Häufig wurden beobachtete Effekte in nur einem Geschlecht nachgewiesen und das meist zu einem distinkten Zeitpunkt.

Diese Studien legen eine überwiegende Involvierung des ER β in das hypertrophe Signalprogramm nahe. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie der Einfluss von ER β bei Myokardhypertrophie und die Progression in die Herzinsuffizienz in einem ER $\beta^{-/-}$ - Mausmodell in beiden Geschlechtern untersucht.

1.4 Rolle des Myokardstoffwechsels bei Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz

Das Herz hat fortwährend einen hohen Bedarf an Energie, um spezialisierte zelluläre Abläufe, wie Ionen-transport, Sarkomerfunktion und die Ca²⁺- Homöostase, aufrecht zu erhalten. Das Myokard ist ein „promiskuitiver“ Substratkonsument und nutzt jeden verfügbaren Substrattypen zur Energiegewinnung, da es kaum eigene Speicherkapazitäten besitzt. Bei ausreichender Versorgung mit Sauerstoff (O₂) werden Fettsäuren und Glukose im Mitochondrium oxidiert. Es wird ein gemeinsames Endprodukt, Acetyl- CoA, gebildet, welches in den Tricarbonsäurezyklus eintritt. Über die reduzierenden Äquivalente NADH und FADH₂, die während des Citrat- Zyklus entstehen, werden Elektronen zur Elektronentransportkette transportiert. Die oxidative Phosphorylierung bildet letztendlich über eine F₀F₁- ATPase ADP zu ATP, welches von der mitochondrialen Matrix über den Adenosin- Nukleotid- Transporter (ANT) ins Zytoplasma transportiert wird und für zelluläre Prozesse zur Verfügung steht (Abbildung 1.5).

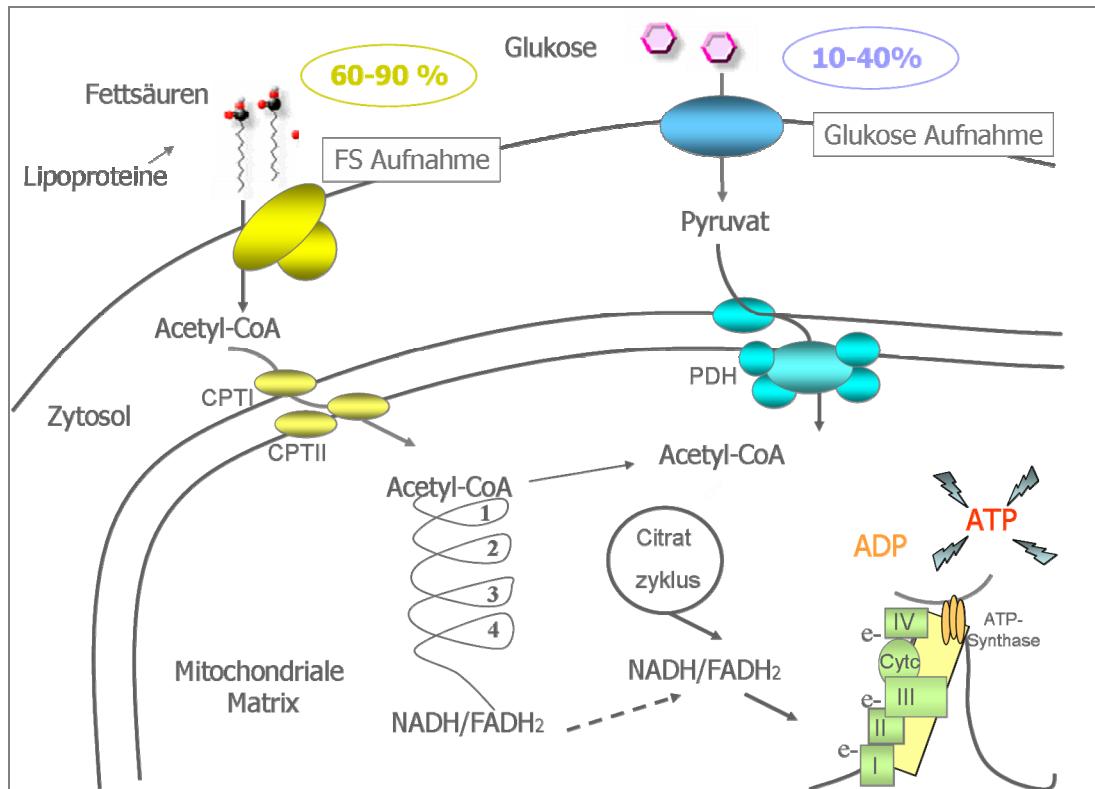


Abbildung 1.5: Signalwege des kardialen Metabolismus. Fettsäure- und Glukoseoxidation sind die Hauptwege für die kardiale ATP-Produktion. Prozesse wie Substrataufnahme, Veresterung, mitochondrialer Transport und Oxidation werden von enzymatischen Reaktionen gesteuert, die über nukleäre Rezeptoren reguliert werden. Die Zahlen 1-4 zeigen die mitochondrialen β -Oxidationsreaktionen: 1) Acyl-CoA-Dehydrogenase; 2) Enoyl-CoA Hydratase; 3) 3-Hydroxylacyl-CoA-Dehydrogenase; 4) Ketoacyl-CoA-Thiolase; FS-Fettsäuren; CPTI /II –Carnitoyl-Palmitoyl-Transferase I/II; PDH-Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex.

Das adulte gesunde Herz gewinnt 60-90% des ATP aus der β -Oxidation von zirkulierenden, langkettigen, freien Fettsäuren und 10%-40% über die Glukoseoxidation und Laktatverwertung [61,62,63], bis zu 2% werden über die anaerobe Glykolyse zur Verfügung gestellt (Abbildung 1.5). Das fetale Herz hingegen nutzt wegen des limitierenden Sauerstoffgehalts und geringerer Verfügbarkeit an Fettsäuren hauptsächlich anaerobe Stoffwechselwege und katabolisiert Glukose und Laktat. In der postnatalen Periode steigt die mitochondriale Fettsäureoxidation begleitend durch einen Anstieg der kardialen Arbeit und der neuen Substratverfügbarkeit sofort an [63,64,65]. Dieser Wechsel geht mit der Expression "adulter" Isoformen metabolischer Enzyme und Proteine einher. Dies ermöglicht trotz höheren Sauerstoffverbrauchs eine höhere Menge der ATP-Produktion pro Mol Substrat im Vergleich zur Glukoseoxidation.

1.4.1 Kardialer Metabolismus bei Myokardhypertrophie

Bei der kardialen pathologischen Hypertrophie sind hypertrophieinduzierte Stoffwechselveränderungen zu erwarten, die je nach Belastung des Herzens und der Verfügbarkeit von ATP angepasst werden. Charakteristisch für die Myokardhypertrophie ist ein Absinken der Genexpressionen der an der mitochondrialen β -Oxidation beteiligten Enzyme im hypertrophierten und im insuffizienten Myokard (Sack et al.) [66]. Es findet ein Wechsel zum fetalen Metabolismus statt, in dem nur etwa 60% der ATP-Moleküle aus der β -Oxidation der Fettsäuren und ca. 40% aus der Glukoseoxidation stammen. Diese metabolische Substratverlagerung in Abhängigkeit von drucklast-induzierter Hypertrophie sowie der geringen Sauerstoffverfügbarkeit wird als adaptiver Mechanismus interpretiert. Die Reaktivierung des fetalen Phänotyps bei Myokardhypertrophie wird als „programmierte“ Stressantwort betrachtet [67]. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen des Substratswechsels sind noch unbekannt.

Diese Substratverschiebung, die sowohl während der Herzentwicklung als auch im hypertrophierten Myokard zu beobachten ist, wird zum Teil infolge von spezifischen, transkriptionellen, regulatorischen Prozessen gesteuert. Diese beeinflussen die Expression von nukleären Genen, die wiederum mitochondriale Proteine kodieren. Auf diese Weise findet eine Anpassung der Substratutilisation an die kardialen Bedürfnisse statt.

1.4.2 Regulatoren des myokardialen Metabolismus –PPAR und Kofaktoren

Die kardiale mitochondriale Kapazität wird sowohl auf transkriptioneller als auch auf post-transkriptioneller Ebene dynamisch reguliert [68]. Akute Änderungen im Energiefluss durch metabolische Signaltransduktionswege werden durch Veränderungen der Substratkonzentration und allosterische Modifikationen der an der Reaktion beteiligten Enzyme verursacht. Chronische Veränderungen in der mitochondrialen oxidativen Kapazität und Substratauswahl werden auf der transkriptionellen Ebene vermittelt [69].

Regulatoren des kardialen Metabolismus sind die „*peroxisome proliferator-activated receptors*“ (PPAR). Diese spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung des Lipid- und Glukosestoffwechsels [70,71]. Zusätzlich zu ihrer metabolischen Funktion sind die PPAR auch an Prozessen, wie dem zellulären Wachstum, der Wundheilung und der Inflammation beteiligt [72,73].

Die PPAR gehören, wie die Retinoid-, Thyroid und Steroidrezeptoren, zu der Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren. Diese werden sowohl durch natürliche als auch synthetische Liganden aktiviert und modulieren die Transkription ihrer Zielgene. Die PPAR-Familie besteht aus drei Isoformen: PPAR α , β/δ und γ [74,75].

Die Proteinstruktur der PPAR ist der Struktur anderer Kernrezeptoren, wie beispielsweise der von Östrogenrezeptoren, homolog (siehe Abbildung 1.3). Nukleäre Rezeptoren besitzen einen modularen Aufbau, bestehend aus verschiedenen Regionen, welche autonomen funktionellen Domänen entsprechen (Abbildung 1.6). Die Gene für alle drei Isoformen sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert. Das Gen für PPAR α liegt auf Chromosom 22q12-13.1, während das Gen für PPAR β/δ auf dem Chromosom 6p21.2-21.1 und für PPAR γ auf dem Chromosom 3p25 liegt.

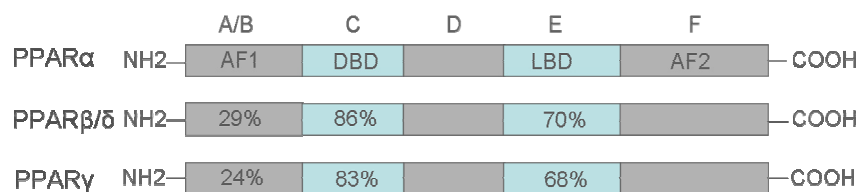


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der PPAR-Isoformen und der Homologiegrad von PPAR β/δ und PPAR γ zu PPAR α .

PPAR werden ligandenabhängig, z.B. endogen über Fettsäuren, Eicosanoide und Arachidonsäurederivate aktiviert [4,76]. Ferner werden die Transkriptionsfaktoren auch über selektive synthetische Liganden, wie z.B. Fibrate und Thiazolidine, die für eine medikamentöse Behandlung eingesetzt werden, induziert. Aktivierte PPAR dimerisieren mit dem „9- *cis* retinoic acid- activated receptor“ (RXR) [77,78]: Die Aktivität des PPAR/RXR Komplexes wird durch die Verfügbarkeit der Liganden reguliert. Findet eine Aktivierung statt, so rekrutieren die PPAR transkriptionelle Ko- Aktivatoren, die für die Initiierung der Transkription der Zielgene notwendig sind[79] (Abbildung 1.7). Ko- Aktivatoren besitzen meist eine Histon- Acetylase (HAT)- Aktivität oder rekrutieren andere Ko- Aktivatoren, die über eine HAT- Aktivität verfügen. Die Acetylierung der Histone erlaubt den Zugang der RNA- Polymerase an die Ziel- DNA und den Transkriptionsstart. Einige Ko- Aktivatoren, wie z.B. Steroidrezeptor- Ko- Aktivatoren (SRC), PPAR- interagierendes Protein (PRIP), p300 und PPAR γ - Koaktivator 1 α (PGC-1 α), interagieren mit den PPAR. PGC-1 α ist der am Besten charakterisierte Ko- Aktivator von PPAR α im kardialen Gewebe.

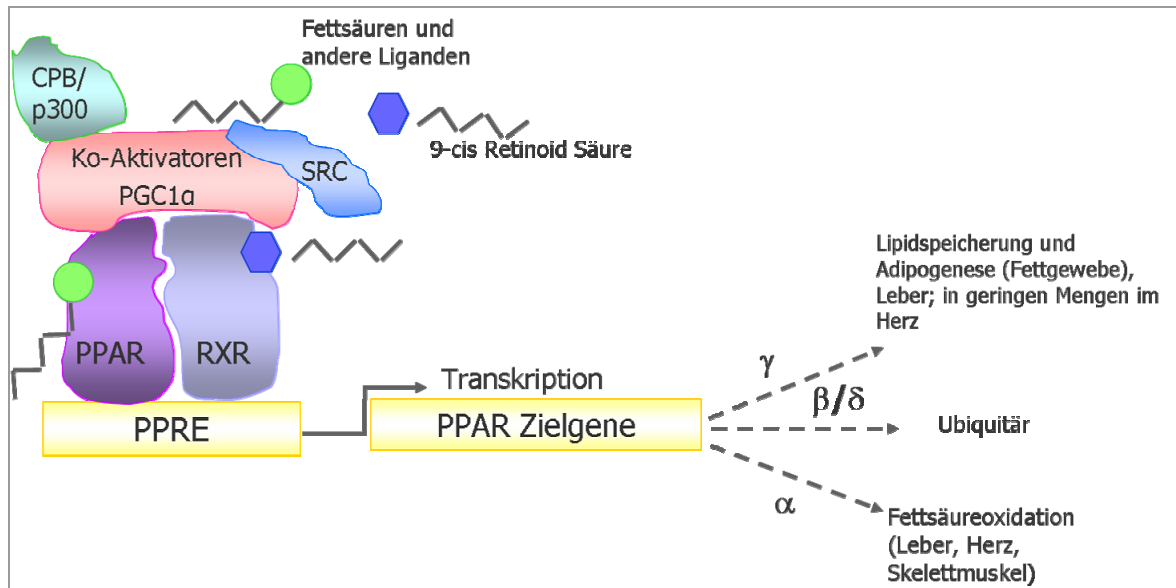


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des PPAR Transkriptionskomplexes (modifiziert nach Kelly D. et al. 2003). Die Bindung eines Liganden an eine PPAR-Isoform führt zur Aktivierung und Rekrutierung von Ko-Aktivatoren. Es folgt eine Heterodimerisierung mit dem RXR. Das PPAR-RXR-Heterodimer bindet mit seinen Bindungsdomänen an das PPAR responsive Element (PPRE) und initiiert die Transkription diverser Zielgene.

Trotz der teils hohen Homologie in ihrer Proteinstruktur weisen die Isoformen Heterogenität zueinander auf. Das Expressionsmuster der drei PPAR- Isoformen ist gewebespezifisch zum Teil sehr unterschiedlich ausgeprägt und weist auf ihre verschiedenen biologischen Funktionen hin.

Im kardiovaskulären Gewebe ist hauptsächlich **PPARα** lokalisiert. Diese Isoform wird überwiegend in Geweben exprimiert, die eine erhöhte Kapazität der mitochondrialen Fettsäureoxidation aufweisen, wie Herz, Leber oder Niere[80]. Als Transkriptionsfaktor reguliert PPARα ein weites Spektrum an Zielgenen, deren Produkte im Lipidstoffwechsel involviert sind [81]. Im Myokard reguliert PPARα die Expression von Genen, deren Produkte in den zellulären Fettsäuremetabolismus involviert sind. Dazu gehören der Fettsäuretransport und die Veresterung, der Import von Fettsäuren in das Mitochondrium sowie die mitochondriale und peroxisomale Fettsäureoxidation [82]. Huss et al. zeigten in diesem Zusammenhang, dass in PPARα- defizienten Mäusen die Fettsäureoxidation dysreguliert ist: Die Aufnahme der freien Fettsäuren ist deutlich eingeschränkt, während der Glukosestoffwechsel ansteigt. Die Folgen sind Lipidakkumulation und Lipotoxizität im Myokard [4]. Weiterhin zeigten PPARα- defiziente Mäuse nach Induktion einer Hypertrophie eine im Vergleich zu Wildtyp- Tieren stärkere Hypertrophieentwicklung. Der Verlust von PPARα resultierte in einem ausgeprägten kardialen Wachstum und erhöhter

kardialer Dysfunktion, assoziiert mit erhöhter Expression inflammatorischer Marker und stärkerem Remodeling [83].

PPAR β/δ wird ubiquitär im Organismus und in besonders hohen Mengen in Kardiomyozyten exprimiert [84]. PPAR β/δ ist sowohl an der Kontrolle des Fettsäurekatabolismus, der Energieentkopplung des Fettgewebes und der Muskulatur als auch der negativen Regulierung der Inflammation beteiligt [85] und scheint darüber hinaus ein kritischer Regulator der β -Oxidation im kardialen Gewebe zu sein [86]. Cheng et al. konnten zeigen, dass die Expression oxidativer Gene in Mäusen mit einer herzspezifischen PPAR β/δ -Deletion supprimiert ist, wodurch Lipide in den Kardiomyozyten stark angereichert werden. Ferner entwickeln diese Tiere eine Myokardhypertrophie, die unweigerlich zur dilatierten Kardiomyopathie führt, in der verminderte Kontraktions- und Relaxationsfähigkeiten zu beobachten sind. Diese Prozesse werden von Apoptose der Kardiomyozyten begleitet und führen zum Tod der Tiere [87].

Der Transkriptionsfaktor **PPAR γ** wird hauptsächlich im Fettgewebe und in der Leber exprimiert. Dort kontrolliert er die Lipidspeicherung, die Adipozytenformation und den Metabolismus. Ferner ist PPAR γ auch außerhalb des Fettgewebes lokalisiert: in der vaskulären Wand, im Muskel und im Myokard. Die Expressionsrate von PPAR γ liegt weit unter der von PPAR α und PPAR β/δ [88]. Die exakten molekularen Mechanismen, die zur Regulierung des kardialen Metabolismus durch PPAR γ führen, sind noch unklar. Dennoch gibt es direkte Hinweise auf eine protektive Wirkung von PPAR γ in der Myokardhypertrophie [89]. Mäuse mit PPAR γ -defizienten Kardiomyozyten hingegen zeigen eine progressive Myokardhypertrophie und oxidative Schäden in den Mitochondrien. Die meisten Tiere sterben an einer dilatativen Kardiomyopathie [89][90]. Zusammenfassend suggerieren diese Daten, dass eine kardiale Hypertrophie über PPAR γ -abhängige Signalwege vermindert und verhindert werden kann.

Darüber hinaus konnten wir in eigenen Experimenten zeigen, dass die Expression von PPAR γ nach MI im Rattenmodell signifikant erhöht ist. Diese Beobachtung korrelierte mit der Expression fibrotischer Marker. Die Expression der an der Fettsäureoxidation beteiligten Enzyme ist reduziert, so dass wir Zusammenhänge zwischen PPAR γ und fibrotischen sowie inflammatorischen Mechanismen annehmen [91].

PGC-1 α , der transkriptionelle Ko-Aktivator der PPAR, spielt eine Schlüsselrolle in der Kontrolle des myokardialen Stoffwechsels [92,93]. PGC-1 α agiert über PPAR α und andere Transkriptionsfaktoren im Myokard, um die Substratanforderung an die Genexpression der am Stoffwechsel beteiligten Enzyme zu koppeln [94]. In Kardiomyozyten führt die Aktivierung von PGC-1 α zu einer Induktion von PPAR α - und

PPAR γ - Zielgenen, welche die Enzyme der Fettsäureoxidation kodieren [93]. Um die mitochondriale Biogenese und die Expression von Komponenten der Elektronentransportkette zu verstärken, koaktiviert PGC-1 α auch weitere Transkriptionsfaktoren, wie die *Estrogen Related Receptors* (ERR α und ERR γ) und den nukleären Respirationsfaktor 1 (NRF- 1) [93,95].

Eine Vielzahl an Studien hat *in vitro* und *in vivo* gezeigt, dass PGC-1 α eine wichtige Rolle in der Energieregulation sowohl im physiologischen als auch im pathologischen Zustand übernimmt [96]. PGC-1 α wird in erheblich aktiviert, wenn physiologische Bedingungen einen erhöhten Bedarf für die myokardiale ATP- Produktion signalisieren, insbesondere wenn eine hohe Anforderung an Fettsäuren als Energiequelle besteht. Dies ist der Fall bei akutem Nahrungsmangel, bei Diabetes Mellitus, aber auch bei Ausdauertraining [85,93,97,98]. Eine Fülle an experimentellen Studien weist darauf hin, dass die Expression von PGC-1 α bei Herzerkrankungen ebenfalls verändert ist [68,99,100,101]. Bei kardialer Hypertrophie in murinen Modellen sind PGC-1 α und mitochondriale Gene reprimiert [65,94]. Diese Reduktion könnte zu einem ATP- Mangel sowie zu verschiedenen Dysfunktionen im insuffizienten Herzen führen.

Es besteht allgemeiner Konsens darüber, dass die PPAR und die beteiligten Ko-Aktivatoren eine Schlüsselrolle im kardialen Stoffwechsel spielen. Eine Vielzahl an Studien hat einen Substratwechsel in Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz bestätigt [66,102,103,104,105]. Allerdings variiert die Richtung der Energieverschiebung mit der Ätiologie und dem Schweregrad der linksventrikulären Dysfunktion. Obwohl hinreichende Untersuchungen zum kardialen Metabolismus existieren, bleibt die Frage offen, ob es im kardialen Stoffwechsel geschlechtsspezifische Mechanismen gibt und wie diese molekularen Prozesse reguliert werden.

1.4.3 Geschlechtsspezifische Aspekte im Myokardstoffwechsel bei Myokardhypertrophie

Es gibt nur wenige Studien darüber, wie das Geschlecht den kardialen Stoffwechsel beeinflusst. Geschlechterunterschiede beim Menschen finden sich jedoch in der Auswirkung von Polymorphismen in den Genen von PPAR α , PPAR γ und PGC-1 α , die eine entscheidende Rolle in der Regulation des kardialen Stoffwechsels übernehmen und mit der Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie, Bluthochdruck, Fettleibigkeit und einer Störung des Lipidstoffwechsels assoziiert sind. Das Auftreten dieser Erkrankungen ist zwischen Frau und Mann unterschiedlich [106,107,108,109].

Im Tiermodell konnte in PPAR α - defizienten Mäusen gezeigt werden, dass eine Inhibierung der Fettsäureoxidation zu einer schweren Lipidakkumulation, Myokardhypertrophie und zum Tod führen konnte. Die Mortalität dieser Tiere war

geschlechtsabhängig: Männchen starben zu 100%, während die Mortalität der Weibchen nur 25% betrug [110,111]. Dies macht PPAR- assoziierte Signalwege zu primären Kandidaten bei der Suche nach Grundlagen von Geschlechterunterschieden bei MH.

PPAR können bei geschlechtsspezifischen Signalwegen durch die Induktion ihrer Zielgene interferieren und kompetieren somit um die Kofaktoren mit anderen nukleären Rezeptoren, wie Östrogenrezeptoren und *Estrogen related Receptors* (ERR). So können PPAR die Östrogen- und die Testosteronsynthese in isolierten Ovarienzellen inhibieren. Ferner spielt speziell PPAR γ in der Steroidogenese in Ovarien eine wichtige Rolle. Der Transkriptionsfaktor fungiert hier durch die Bindung an das „Estrogen Responsive Element“(ERE) als kompetitiver Inhibitor für Östrogen [112,113]. Diese Beobachtungen sind möglicherweise zellspezifisch, könnten für andere Zelltypen und Organe jedoch ebenso zutreffen. Erst kürzlich konnte im ER $\beta^{-/-}$ - Mausmodell gezeigt werden, dass ER β die Aktivität von PPAR γ im gonadalen Fettgewebe inhibiert und in Folge der Glukose- und Insulinmetabolismus negativ beeinflusst wird [114]. Damit wurde ein weiterer Einfluss des Östrogenrezeptors β im Organismus demonstriert.

Weitere interessante Beobachtungen sind mögliche Wechselwirkungen zwischen PPAR, PGC-1 α und den Östrogenrezeptoren in den Mitochondrien. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Östrogenrezeptoren in Mitochondrien lokalisiert sind [115][116]. Ferner wurden ERE in der regulatorischen Einheit mitochondrialer DNA determiniert [117]. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass Östrogenrezeptoren die Transkription mitochondrialer DNA beeinflussen und sie selbst in Mitochondrien aktiv sind. Zudem haben Stirone et. al in cerebrovaskulären Mitochondrien gezeigt, das Östrogen die Effizienz der Energieproduktion erhöht und die Freisetzung freier Radikale (Reactive Oxygen Species- ROS) supprimiert [118]. Darüber hinaus ist bekannt, dass Östrogen den Glukosestoffwechsel in der Leber und im Muskel dominant beeinflusst [119,120]. Der Einfluss von Östrogen auf den kardialen Glukosestoffwechsel und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind noch ungeklärt.

Nukleäre Rezeptoren, wie PPAR und die Östrogenrezeptoren besitzen die Eigenschaft, eine Vielzahl von Genen in verschiedenen Organ- und Zellsystemen zu regulieren. Daher soll untersucht werden, inwiefern Regulatoren des Glukosestoffwechsels und der Fettsäureoxidation sowie Schlüsselenzyme dieser Energie bereitstellenden Signalwege durch eine artifiziell induzierte Myokardhypertrophie geschlechtsspezifisch beeinflusst werden.

1.5 Strukturelle Veränderungen des Herzens bei Myokardhypertrophie: Remodeling

Die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und Herzinsuffizienz wird von makroskopischen und mikroskopischen Veränderungen der Herzstruktur begleitet. Umbauprozesse dieser Art sind vor allem frühe Ereignisse bei Drucküberbelastung des Myokards, wie z.B. bei der Aortenstenose.

Die frühe Phase der kardialen Hypertrophie wird als kompensierte Hypertrophie bezeichnet. Die kardiale Stressantwort resultiert in der Zunahme der Wanddicke des Herzens, um die Mehrbelastung auszugleichen. Ursächlich dafür sind eine Größenzunahme der Kardiomyozyten und die Ablagerung von Kollagenen und anderer Komponenten der extrazellulären Matrix. Letzteres wird als Fibrose bezeichnet [121]. Die Entwicklung einer Myokardhypertrophie und einer reaktiven Fibrose scheint durch die Zunahme des kardialen Wandvolumens den transmuralen Stress zu mildern. Mit dem Progress einer Fibrose (perivaskulär und interstitiell) verliert jedoch das Herz an Elastizität; es ist eine erhöhte Steifigkeit des Herzmuskels zu beobachten. Kontraktilität und Dehnbarkeit des Herzens sind gestört (Jalil et al. 1989) [122]. Im weiteren zeitlichen Verlauf verliert das Herz seine normale Funktion. Die Entwicklung einer ausgeprägten Fibrose geht einer dekompenzierten Hypertrophie meist voraus und spielt somit eine kausale Rolle [121]. Diesen fundamentalen Veränderungen in der Herzstruktur liegen molekulare Prozesse zugrunde, die das Fortschreiten der Myokardhypertrophie bis zur Herzinsuffizienz beeinflussen.

1.5.1 Extrazelluläre Matrix

Die kardialen Myozyten stehen mit einem komplexen Geflecht extrazellulärer Makromoleküle in Verbindung, das man als extrazelluläre Matrix (EZM) bezeichnet [123]. Die EZM bildet den Anteil tierischen Gewebes zwischen den Zellen im Intrazellularraum. Diese setzt sich aus diversen Komponenten zusammen, die in zwei Gruppen aufgeteilt werden können: Grundsubstanz und Fasern. Zu Letzterem zählen die Kollagenfibrillen und die elastischen Fasern, die vor allem von Fibroblasten sezerniert werden und dem Gewebe Stabilität und Elastizität verleihen. Die Grundsubstanz besteht aus Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und Glykoproteinen (Adhäsionsproteinen), die von den Fibroblasten produziert werden, sowie der Gewebsflüssigkeit, deren Bestandteile (Wasser, Aminosäuren, Ionen, Vitamine, Hormone, Glukose und andere) hauptsächlich aus dem Blutplasma stammen.

Die wesentlichen Komponenten der EZM sind die Kollagene des Typs I, III und V, sowie das Kollagen IV der Basalmembran (Bishop, et al., 1999) [124]. Ihre Aufgabe ist die Verknüpfung der Myozyten untereinander bei gleichzeitiger Herstellung einer Verbindung

zu den Kapillaren. Kollagene sind nicht nur wichtige Determinanten für Form und Struktur, sondern auch maßgeblich an der Funktion des kardiovaskulären Gewebes beteiligt. Aus diesem Grund ist es entscheidend, dass Konzentration und Verhältnis der Kollagene zueinander präzise reguliert sind und ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Abbau und Synthese besteht.

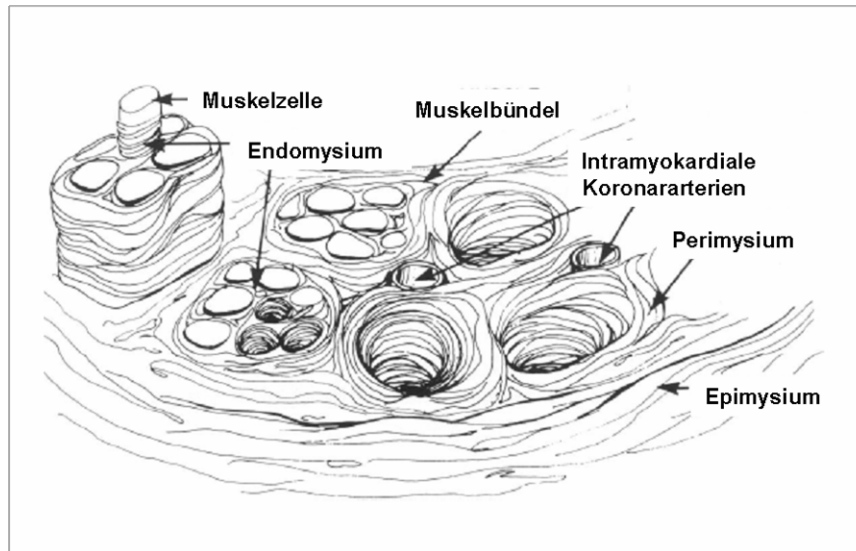


Abbildung 1.8: Vereinfachte Darstellung des kollagenen Netzwerkes. Es stellt das komplexe Geflecht des Myokards dar. Die epimysialen, perimysialen und endomysialen Fasern gehen kontinuierlich in die Chordae tendinae über. (nach Pick, Janicki und Weber, 1989, AJP)[122].

1.5.2 Matrixmetalloproteinasen und deren Inhibitoren

Die gesamte EZM unterliegt einem ständigen Umbau [125,126], der vorrangig durch die 1962 erstmalig von Gross und Lapiere beschriebenen Matrixmetalloproteinasen (MMP) ausgeführt wird [127]. Die MMP bilden eine Familie zinkabhängiger Endoproteasen, die strukturelle Domänen teilen, sich jedoch in Substratspezifität und Induzierbarkeit unterscheiden [127]. Derzeit sind mindestens 25 verschiedene MMP- Typen identifiziert worden, die nicht nur die Kollagene und andere Komponenten der EZM abbauen können [7], sondern zudem die Fähigkeit besitzen, Zelloberflächenmoleküle und andere Nichtmatrixproteine zu spalten [128,129]. Eine strenge Regulation der MMP- Aktivität innerhalb physiologischer Prozesse ist von großer Bedeutung für den Erhalt von Struktur und Funktion des kardiovaskulären Gewebes. Ihre Aktivität kann dabei auf der Ebene der Genexpression, Sekretion, Zymogen- Aktivierung und - Inhibierung kontrolliert werden.

Der Umbau der EZM in Tiermodellen mit Druck- und Volumenüberbelastung sowie in Ischämie und nichtischämischer Kardiomyopathie beim Menschen werden partiell durch die MMP vermittelt [7].

Eine veränderte MMP- Expression und - Aktivität kann zur Entwicklung chronischer Krankheiten führen. Viele unabhängige Studien zeigten eine veränderte Expression diverser MMP innerhalb pathologischer Prozesse, wie Angiogenese, Metastasierung, Arthritis und diverser Herzerkrankungen [130].

Die Aktivität der MMP wird über Transkription, posttranslationale Aktivierung der inaktiven Proformen und die Interaktion mit gewebespezifischen endogenen Inhibitoren, den *Tissue Inhibitors of Metalloproteinases* (TIMP) kontrolliert. Bei Verlust des Gleichgewichtes zwischen MMP und TIMP ist der Umbau von myokardialen Kollagenen gestört und führt zur Kollagenablagerung im linken Ventrikel [7,131,132]. Dieser Prozess fördert das linksventrikuläre Remodeling. Die Akkumulierung von kardialem Kollagen ist mit einer systolischen Dysfunktion des linken Ventrikels assoziiert, wie in Patienten mit Aortenstenose gezeigt werden konnte [133]. MMP und TIMP sind in Tiermodellen nach myokardialen Infarkt und in experimentellen Modellen für Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz verschieden reguliert [131,134,135,136].

1.5.3 Geschlechtsspezifische Aspekte im Umbau der extrazellulären Matrix bei Myokardhypertrophie

Myokardiales Remodeling im Alter bzw. als Reaktion auf mechanische Belastung unterscheidet sich in weiblichen und männlichen Herzen [137,138]. Es ist jedoch bislang ungeklärt, welche regulatorischen Prozesse für die beobachteten Geschlechterunterschiede verantwortlich sind. Es gibt nur wenige Studien, die Geschlechterunterschiede im Umbau der extrazellulären Matrix bei druckbelasteter Myokardhypertrophie beschreiben [20]. Dagegen gibt es direkte Hinweise auf Geschlechterunterschiede nach myokardialen Infarkt im Tiermodell. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass die Mortalität sowie die kardiale Ruptur in der akuten Phase nach MI (bis zu einer Woche) in weiblichen Tieren wesentlich niedriger war als in männlichen Tieren [139,140,141,142]. Bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz als Folge des MI haben die männlichen Tiere im Vergleich zu den Weibchen eine schlechtere kardiale Funktion, kombiniert mit maladaptivem Remodeling[139]. Ferner konnten bei akutem MI Geschlechterunterschiede in der Aktivität und Expression der MMP und TIMP beobachtet werden [142].

Es gibt einige Anhaltspunkte dafür, dass Östrogen die Kollagenexpression auf verschiedene Weise beeinflussen kann. Östrogenrezeptoren wurden nicht nur in Kardiomyozyten, sondern auch in Myofibroblasten nachgewiesen [37]. Die Verabreichung von Östrogen in Tierexperimenten kann die Proliferation von Fibroblasten und die Kollagensynthese in diesem Zelltyp reduzieren [143,144]. Damit werden die Kollagenexpression und Umbauprozesse der extrazellulären Matrix und deren

Komponenten beeinflusst. Daher sollten bei der Untersuchung von Geschlechterunterschieden bei Myokardhypertrophie auch Umbauprozesse der EZM berücksichtigt werden.

1.6 Apoptose bei Myokardhypertrophie

Die maladaptive Hypertrophie ist neben den bereits erwähnten Veränderungen durch eine signifikante Zunahme des programmierten Zelltodes (Apoptose) in Kardiomyozyten gekennzeichnet [2,145].

Die Apoptose ist eine physiologische Form des Zelltodes und spielt eine zentrale Rolle in Embryogenese, zellulärer Homöostase, Gewebeverlust und Entfernen geschädigter oder mutierter Zellen [146]. Der Prozess der Apoptose kann in verschiedene biochemische und morphologische Phasen eingeteilt werden [145]:

1. Initiationsphase, in der pro- apoptotische Stimuli molekulare Veränderungen einleiten, die zur Apoptose führen;
2. Effektorphase: apoptotische Prozesse verlaufen mit höchster Kapazität sowie Fragmentierung der DNA;
3. Degradationsphase, in der Membranmarker und morphologische Veränderungen nachweisbar sind.

Die Initiation der Apoptose ist mit der Freisetzung der Cytochrom- C- Oxidase aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma und mit der Steuerung von proteolytischen Kaspasen assoziiert.

Das Auftreten der Apoptose ist in einer Vielzahl von pathophysiologischen Herzerkrankungen, wie der maladaptiven Hypertrophie und Herzinsuffizienz in Patienten sowie in experimentellen Tiermodellen beschrieben worden [147,148,149,150,151,152]. Weiterhin konnte in Patienten mit Herzinsuffizienz festgestellt werden, dass der beobachtete Zelltod der Kardiomyozyten zwischen den Geschlechtern verschieden ist. Die Apoptoserate der Kardiomyozyten ist in Frauen signifikant niedriger als in Männern [153]. Es scheint, dass Frauen mit Herzinsuffizienz besser gegen die Induktion apoptotischer Signalwege geschützt sind [24].

Die funktionale Relevanz der Apoptose bei Herzerkrankungen ist weitgehend unklar und wird kontrovers diskutiert. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Zunahme der Apoptose bei Herzinsuffizienz wesentlich zur Verminderung der kardialen Funktion beiträgt. Es gibt nahezu keine Daten zu der Frage, ob und wie der programmierte Zelltod geschlechtsspezifisch reguliert wird.

1.7 Globale Genexpressionsanalyse: Mikroarray- Technologie

In der Pathogenese komplexer Krankheitsbilder wie der kardialen Hypertrophie laufen parallel eine Vielzahl von Prozessen ab, die auf die resultierende kardiale Funktion einen Einfluss haben. Es ist daher essentiell, die Gesamtheit der biologischen Prozesse adäquat zu erfassen, um ein Verständnis des Krankheitsbildes erzielen zu können. Zudem führen, trotz ihrer Unerlässlichkeit, funktionelle Untersuchungen isolierter Signalwege oder gar einzelner Gene oft zu einer Überinterpretation ihrer Relevanz in Hinblick auf den resultierenden Phänotyp [154].

Die Mikroarray- Technologie gestattet seit einigen Jahren eine genomweite Untersuchung der Genexpression auf Transkriptebene (globale Genexpression). Durch eine Vielzahl unterschiedlicher statistischer Verfahren können die erhaltenen Expressionswerte der Gene analysiert werden. Dies können im einfachsten Fall Gene sein, die zwischen zwei Zuständen dereguliert sind oder aber komplexe Expressionsmuster bei einer größeren Anzahl von Zuständen aufweisen. Für die Interpretation der Daten stehen mehrere explorative Werkzeuge zur Verfügung. Hierzu zählt die "Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery" (DAVID; bzw. als lokale Anwendung "Expression Analysis Systematic Explorer" (EASE)) [155,156]. Dieser Ansatz gestattet es unter anderem, einen Satz von Genen nach "gene ontology" (GO) [157] zu kategorisieren oder KEGG- Signalwegen zuzuordnen und anschließend in Hinblick auf das gesamte Genom eine mögliche Überrepräsentation zu bestimmen. Es kann zwischen den GO- Kategorien "Biologischer Prozess", "Molekulare Funktion" und "Zelluläres Kompartiment" gewählt werden. Innerhalb einer der Kategorien kann aus einer sich baumartig strukturierenden Annotation aus fünf Ebenen die Auflösung festgelegt werden. Die Mikroarray- Analyse gestattet somit einen relativ umfassenden Einblick in die ablaufenden Prozesse und potentiell neue, unerwartete Beobachtungen. Dadurch können solche Daten auch für das Generieren neuer Hypothesen hilfreich sein, die dann in einzelnen funktionellen Studien näher untersucht werden.

1.8 Ziele und Fragestellung

Ziel der vorliegenden Studie war es, Geschlechterunterschiede bei der Entwicklung von Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz und die damit verbundenen myokardialen Veränderungen sowie den Einfluss von Östrogenrezeptor β auf die kardiale Funktion und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen im Mausmodell zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurde in Mäusen mit ER β - Deletion (ER $\beta^{-/-}$) und Wildtyp- Mäusen eine Myokardhypertrophie durch eine transversale Aortenkonstriktion (TAC) induziert. Um die Progression einer kardialen Hypertrophie und die damit verbundenen Veränderungen dokumentieren zu können, wurden zwei Zeitpunkte gewählt. Diese Zeitpunkte sollten die frühe (adaptive) sowie die späte (maladaptive) kardiale Antwort auf drucklast- induzierte Hypertrophie abbilden. Die kardialen Funktionen bei Myokardhypertrophie wurden mittels Echokardiographie und hämodynamischen Messungen charakterisiert. Mikroarray-Analysen sollten einen Überblick über die globale Genexpression und die Geschlechterunterschiede geben und damit zur Generierung von Hypothesen zu den biologischen Prozessen in der Hypertrophieentwicklung und dem Übergang in die Herzinsuffizienz beitragen. Mit molekularbiologischen Untersuchungen sollten die gewonnenen Hypothesen geprüft werden.

Folgende Fragestellungen standen im Mittelpunkt:

1. Gibt es Geschlechterunterschiede in der Morphologie und der Funktion bei drucklastinduzierter Myokardhypertrophie?
 - a. Finden sich Geschlechterunterschiede im zeitlichen Verlauf bei drucklast-induzierter Myokardhypertrophie und der Progression zur Herzinsuffizienz?
 - b. Beeinflusst Östrogenrezeptor β die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und den Übergang in die Herzinsuffizienz und trägt dieser zu den Geschlechterunterschieden bei?
2. Gibt es molekulare Mechanismen, die zu Geschlechterunterschieden bei Myokardhypertrophie und dem Übergang in die Herzinsuffizienz führen?
 - a. Finden sich im globalen Genexpressionsprofil Geschlechterunterschiede nach Druckbelastung? Werden verschiedene grundlegende molekulare Prozesse geschlechtsabhängig reguliert?
 - b. Tragen Veränderungen im kardialen Stoffwechsel, in Umbauprozessen der extrazellulären Matrix und Apoptose zur geschlechtsspezifischen Adaption in der Myokardhypertrophie bei?
 - c. Moduliert ER β die molekulare Antwort auf Druckbelastung und trägt dieser zu Geschlechterunterschieden bei?

2. Material

2.1 Tiere

Stamm der Mäuse: C57/BL6

Genotypen der Mäuse: Wildtyp (WT)

Östrogen Rezeptor β Knock-Out (ER $\beta^{-/-}$)

Die Zucht wurde mit Mäusen des Stammes C57/BL6 Wildtyp und C57/BL6 mit einer genomischen Deletion des ER β der AG Gustafsson [158] in der Tierhaltung des CCR durchgeführt.

2.2 Chemikalien und Fertigreagenzien

Substanz	Firma
Aceton	J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)
Agarose (Elektrophorese)	Biozym (Hess. Oldendorf, Deutschland)
APS	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
BCA	Pierce (Rockford, IL, USA)
β -Mercaptoethanol	Fluka (Darmstadt, Deutschland)
Bromphenolblau	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Chloroform/ Trichlormethan	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
DAPI	Linaris (Wertheim, Deutschland)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Direkt Rot 80	Fluka/ Sigma Aldrich (MO, USA)
DTT	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
EDTA	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Eosin	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Essigsäure	Merck Darmstadt, Germany)
Ethidiumbromid (95%)	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Formaldehyd (4%; pH 6,9)	Merck (Darmstadt, Germany)
Glycerin	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Hämatoxylin Weigerts Lösung A	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hämatoxylin Weigerts Lösung B	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HCL (37%), rauchend	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)

KCL	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
MgCl ₂	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
NaCl	Merck (Darmstadt, Germany)
NaOH	Merck (Darmstadt, Germany)
Paraffin (Typ 6, 9)	Mikrom (Berlin, Deutschland)
Pikrinsäure	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
PonceauS-Solution	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Roti-Load-1 (4x)	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
RNAzol B/RNABee	Tell Test Inc. (Friendswood, TX, USA)
SDS	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Sybr Green	Applied Biosystems (CA, USA)
TEMED	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Tris	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Trizol Reagenz	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe, Germany)
Methanol	Merck (Darmstadt, Germany)
NaCl	Merck (Darmstadt, Germany)
NaOH	Merck (Darmstadt, Germany)
KOH	Merck (Darmstadt, Germany)
Xylol	Merck (Darmstadt, Germany)

2.3 Puffer und Lösungen

Bezeichnungen	Zusammensetzung
Blocking Reagenz	5% Magermilchpulver in 1xTBS-T Puffer
Elektrophoresepuffer	25mM Tris
	250mM Glycin
	3,5mM SDS
DNA-Gel-Ladepuffer	30% Glycerin, 10mM EDTA (pH 8), 0,25% BPB
SDS-Gel-Ladepuffer	0,125 Tris-HCl (pH 6,8), 20% Glycerin, 4% SDS, 1,4 M β -Mercaptoethanol, 0,1v% BPB
PBS-T Puffer (10mM)	1 PBS-Tablette, pH 7,4 (Calbiochem)
	in 1L Wasser
	140mM NaCl
	3mM KCl
Proteinlysis Puffer	10mM Tris, pH7,5
	140mM NaCl
	1mM EDTA
	25% Glycerin
	0,5% SDS
	0,5% Nonident P-40
	100ng/ μ l Protein Inhibitor Cocktail
Stripping Puffer	25mM Glycin
	3,5mM SDS
	pH 2 mit Schwefelsäure 37% einstellen
TBE Laufpuffer (10x):	890mM Tris
	890mM Borsäure
	20mM EDTA
TBS-T Puffer	137mM NaCl
	20mM Tris
	0,1% Tween 20 (v/v)
Transferpuffer (nach Towbin[159])	193,7mM Glycin
	25mM Tris
	20% Methanol
Sammelgelpuffer	1M Tris, pH 6,8
Trenngelpuffer	1,5M Tris, pH 8,8
Waschpuffer I (Affymetrix)	0,9M NaCl, 0,06M NaH_2PO_4 , 6mM EDTA, 0,01% Tween-20
Waschpuffer II (Affymetrix)	100mM MES (2-N-Morpholinoethane-sulfonic acid, Sigma), 0,1M NaCl, 0,01% Tween-20

DNA-Agarosegel	1% bis 1,5% Agarose (w/v) in 1x TBE-Puffer
SDS-Acrylamidgele	
(Trenngel 8%, 10%)	Tris (pH 8,8); 10% SDS; 10% APS; 10% Temed
(Sammelgel 4%)	Tris (pH 6,8); 10% SDS; 10% APS; 10% Temed; 2% Pyronin
Färbelösungen	
Coomassie Brilliantblau Färbelösung	0,25g Coomassie Brilliantblau
	10% Essigsäure
	40% Methanol
	in Wasser
Coomassie Brilliantblau Entfärbelösung	10% Essigsäure
	40% Methanol
	in Wasser
HE-Färbelösung	Hämatoxylin Weigerts Lösung A
	0,1% Eosin
	1 Tropfen Essigsäure
Sirius Rot-Lösung	Direkt Rot 80
	Pikrinsäure

2.4 Oligonukleotide (Primer)

Alle hier verwendeten Primer wurden von den Firmen BioTeZ, Berlin Buch und Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland, synthetisiert.

Identifizierung	Primer 5' -> 3'	Amplifikat Länge in bp
ERbKO NEO	GCA GCC TCT GTT CCA CAT ACA CTT C	
ERbKO EXON 3	AGA ATG TTG CAC TGC CCC TGC TGC T	
ERbKO INT 2	GGA GTA GAA ACA AGC AAT CCA GAC ATC	
ACOX Forward	TTC TCA CAG CAG TGG GAT TC	132
ACOX Reverse	CCC GAC TGA ACC TGG TCA TA	
ANP Forward	CCT GTG TAC AGT GCG GTG TC	108
ANP Reverse	CCT CAT CTT CTA CCG GCA TC	
ATP5K Forward	CTA AAA CCC CGG GCA GAG	114
ATP5K Reverse	GAG AAT GCT GTC ATC TTG AGC TT	
BNP Forward	GCA CAA GAT AGA CCG GAT CG	144
BNP Reverse	CAG GCA GAG TCA GAA ACT GGA	
CD36 Forward	CCT CTG ACA TTT GCA GGT CCA T	133
CD36 Reverse	AAA CAG TGG TTG TCT GGG TTC TG	
COX7A2 Forward	TAT TTG CCA CAC CAA CCA AA	86
COX7A2 Reverse	TCA GGT GGA AAC CAT CAG C	
COX10 Forward	TCA GGA ATG TCA GTA ATC AGT GG	69
COX10 Reverse	CCT GTG CAG CTG TGT GAC AT	
ERR α Forward	GGA GGA CGG CAG AAG TAC CAA A	129
ERR α Reverse	GCG ACA CCA GAG CGT TCA C	
ERR γ Forward	GCC AGC CCA AAA GCC ATA	71
ERR γ Reverse	CAG GCA TGG CAT AGA TCT TCT	
GLUT1 Forward	TTG TTG TAG AGC GAG CTG GA	164
GLUT1 Reverse	TTC AAA GAA GGC CAC AAA GC	
GLUT4 Forward	GCT TGG CTC CCT TCA GTT TG	136
GLUT4 Reverse	GTG CCT TGT GGG ATG GAA TC	
HPRT Forward	GCT TTC CCT GGT TAA GCA GTA CA	78
HPRT Reverse	ACA CTT CGA GAG GTC CTT TTC AC	
MCAD Forward	CAG ATT TTC GGA GGC TAT GGA TT	219
MCAD Reverse	ACG AGC TAT GAT CAG CCT CTG AA	
MMP2 Forward	TAC GAT GAT GAC CGG AAG TG	154
MMP2 Reverse	GGA AGT TCT TGG TGT AGG TG	

MMP9 Forward	GGA TGG TTA CCG CTG GTG	89
MMP9 Reverse	CTA CGG TCG CGT CCA CTC	
MyH6 Forward	GCC AAG ACT GTC CGG AAT GA	131
MyH6 Reverse	TGG AAG ATC ACC CGG GAC TT	
MyH7 Forward	CAA AGG CAA GGC AAA GAA AG	149
MyH7 Reverse	TCA CCC CTG GAG ACT TTG TC	
NDUFA5 Forward	AGG GTG GTG AAG TGG AAG AG	126
NDUFA5 Reverse	TGG CCA CTT CCA CTG GTT A	
NDUFS4 Forward	GAT GGG AAA ATC CTT TGA TGG	86
NDUFS4 Reverse	GAA GGT CAG AAC CAT GTT GGA	
LPL Forward	GCC AAG AGA AGC AGC AAG AT	101
LPL Reverse	CCA TCC TCA GTC CCA GAA AA	
PDK-4 Forward	CAG CTG GTG AAG AGC TGG TA	94
PDK-4 Reverse	CTT CTG GGC CTC TCT TCT CAT	
PGC-1 α Forward	GAA AGG GCC AAA CAG AGA GA	63
PGC-1 α Reverse	GTA AAT CAC ACG GCG CTC TT	
PTEN Forward	GGC ACA AGA GGC CCT AGA TT	77
PTEN Reverse	GCC PCT GAC TGG GAA TTG TG	
TIMP1 Forward	GCA AAG AGC TTT CTC AAA GAC C	73
TIMP1 Reverse	AGG GAT AGA TAA ACA GGG AAA CAC T	
TIMP2 Forward	CGT TTT GCA ATG CAG ACG TA	138
TIMP2 Reverse	CTT CTT TCC CAC CAC TTT GG	
Essr-Sonde		

2.5 Antikörper

Identifizierung	Konzentrationsangabe ; Verdünnungsfaktor	Verdünnung in	Hersteller
Primäre Antikörper			
GAPDH	1000 μ g/ml;1:50.000	TBS-T	Chemicon
PGC-1 α	200 μ g/ml;1:400	TBS-T	Santa Cruz
PPAR α	200 μ g/ml;1:200	TBS-T	Santa Cruz
PPAR β/δ	200 μ g/ml;1:400	TBS-T	Santa Cruz
PPAR γ	200 μ g/ml;1:200	TBS-T	Santa Cruz
Sekundäre Antikörper			
Donkey anti mouse	400 μ g/ml/1:15 000	TBS-T	Dianova
Donkey anti rabbit	400 μ g/ml /1:10 000	TBS-T	Dianova
Antikörper für Immunhistologie			

FITC	1:100	TBS-T	Dianova
DAPI	1:20.000	TBS-T	Dianova

2.6 OP-Zubehör

Substanz / Material / Gerät	Firma
Anästhesie	
Isofluran	Boehringer Ingelheim (Deutschland)
Ketamin/Xylasin	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trapanal	Altana Pharma (Konstanz, Deutschland)
Analgesie	
Binocular	Leica (Wetzlar, Deutschland)
Injektionsspritzen (1ml)	Braun (Melsungen, Deutschland)
Kanülen (0,45x12mm)	Braun (Melsungen, Deutschland)
NaCl (0,9%)	Heiland (Hamburg, Deutschland)
Rimadyl	Pfizer (Karlsruhe, Deutschland)
Nahtmaterial	
Mersilene (2.0)	Ethicon (Norderstedt, Deutschland)
Seidenfaden (6.0)	Fine Sciene Tools (Heidelberg, Deutschland)
Perma Hand Seide (6.0)	Ethicon (Norderstedt, Deutschland)
Operationsbesteck	
Pinzetten, Augenscheren, Haken, Nadelhalter	Fine Science Tools (Heidelberg, Deutschland)
Rotlicht	Petra (Burgau, Deutschland)
TIP-Katheter	Millar Instruments Inc.(Houston, TX, USA)
Venenverweilkatheter (22G)	Braun (Melsungen, Deutschland)
Ventilationsmaschine (Mouse Mini Vent)	Hugo Sachs Elektronik (Deutschland)

2.7 Sonstiges

Enzyme	
DNAse I	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Proteinase K	Invitek (Berlin, Deutschland)
Proteinaseinhibitorcocktail (PIC)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
RNase A	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
RNase Out	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Superscript II (Reverse Transkriptase)	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Taq-Polymerase	Rapidozym (Berlin, Deutschland)

Molekulare Marker	
DNA-Ladder	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
Kommerzielle Kit-Systeme	
BCA protein assay Kit	Pierce (Rockford, IL, USA)
ECL Detektionskit	Amersham Biosciences, (NJ, USA)
Invisorb Spin Tissue Mini Kit	Invitek (Berlin, Deutschland)
FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit	Calbiochem; Merck (Darmstadt, Deutschland)
Sonstige Verbrauchsmaterialien	
Autoradiographiefilme	Kodak (Stuttgart, Deutschland)
Combitips	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Eppendorfreaktionsgefäße (1,5ml; 2,0ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eindeckmedium (Vectamount)	Vector/Linaris (Wertheim, Deutschland)
Falconröhrchen	BD Biosciences (Erembodegem, Belgium)
Kunststoffpipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Kunststoffpipettenspitzen mit Filter	Biozym (Hess. Oldendorf, Deutschland) MM-Papier Whatman (Northbrook, IL, USA)
Nitrozellulose, Hybond-ECL	Amersham Biosciences (NJ, USA)
Objektträger (Superfrost)	Menzel-Gläser (Braunschweig, Deutschland)
PCR-Reaktionsgefäße (0,2ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Petrischalen	Techno Plastic Products (Schweiz)
Quarzküvetten	Hellma (Mülheim, Deutschland)

2.8 Geräte

Gerät	Firma
Abzug	Köttermann (Uetze, Deutschland)
Chemilumineszenz-Scanner Curix 60	Agfa (Köln, Deutschland)
Einbettautomat „Shandon Citadel 1000“	Thermo Electron Corporation
Geldokumentationsanlage	INTAS (Göttingen, Deutschland)
Homogenisator Fast Prep FP 120	Thermo Savant Thermo Inc. (USA)
Master Cycler Gradient	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mikroskop	Zeiss AxioVert, Leica Fluoreszenz
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
pH-Meter	Mettler, (Giessen, Deutschland)
Power Supply	Amersham Pharmacia Biotech (NJ, USA)
Präzisionswaage	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
SDS-Gelsystem	BioRad (Hercules, CA, USA)

Schüttler „Rocky“	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Taqman ABI 7300	Applied Biosystems (CA, USA)
Thermomixer comfort/ compact	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Tischzentrifugen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Vortexer	Janke & Kunkel (Staufen, Deutschland)
Wärmeschrank	GFL 3033 (Burgwedel, Deutschland)
Zentrifugen	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.9 Software

Softwarebezeichnung	Firma
ABI 7300 Software	Applied Biosystems (CA, USA)
Alpha Ease FC	Adobe Systems Incorporated (CA, USA)
AxioVision Rel. 4.6	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
BCA- Microplate Manager	BioRad (Hercules, CA, USA)
Chart 5 AD Instruments	AD Instruments (USA)
EndNote 9.0	Thomson ISI Research
Image J-Bildanalyse Software	Image J
INTAS Software Gel imager	INTAS (Göttingen, Deutschland)
Microsoft Office 2003	Microsoft (USA)
Photoshop 7.0	Adobe Systems Incorporated (CA, USA)
PowerLab	AD Instruments (USA)
Sigma Plot 8.0	Systat Software Inc. (Richmont, CA, USA)
SPSS 15.0 for Windows	SPSS Inc. (Chicago, IL, USA)
2100 Expert	Agilent Technologies (USA)

3. Methoden

3.1 Tierexperimentelle Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes nach Erteilung der Genehmigung zur Vornahme von Versuchen an lebenden Wirbeltieren für das Versuchsvorhaben G0084/05, die am 25.02.2005 vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSi) genehmigt wurde.

3.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Standardfutter (ad libitum). Die Haltung der Tiere erfolgte in Gruppen unter spezifiziert pathogenfreiem Status (SPF) in IVC-Standardkäfigen in klimatisierten Räumen. Die Belichtung erfolgte in einem 12-Stunden-Tages-/ Nacht- Rhythmus. Der Gesundheitszustand wurde täglich durch das Pflegepersonal sowie durch monatliche veterinärmedizinische Kontrollen überwacht. Die Tierhaltung und die Tierexperimente wurden durch das Komitee für den Tierschutz an der Charité Universitätsmedizin Berlin geprüft und gemäß den Vorgaben durchgeführt.

3.1.2 Mausstämme

Für alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden Wildtyp (WT)- und Östrogenrezeptor β - Knock-out ($ER\beta^{-/-}$) [158]- Mäuse des Stammes C57BL/6J weiblichen und männlichen Geschlechts verwendet. Diese Mäuse wurden uns freundlicherweise von der AG Gustafsson des Karolinska Institutes, Schweden, zur Verfügung gestellt.

Zur Auswahl der geeigneten Zuchttiere wurden die Mäuse im Alter von drei Wochen genotypisiert

3.1.3 Genotypisierung

Für die Genotypisierung wurde noch nicht abgesetzten juvenilen Mäusen im Alter von ca. drei Wochen ein kleines Stück der Schwanzspitze ($\leq 5\text{mm}$) entfernt. Die im Rahmen der Genotypisierung erforderliche dauerhafte Markierung der Mäuse, wurde mit einer Ohrlochmarkierung vorgenommen. Aus der Schwanzspitze wurde die genomische DNA (gDNA) isoliert. Für die Isolierung der gDNA wurde das Isolationskit „Invisorb Spin Tissue Mini Kit“ von Invitex verwendet und das Protokoll des Herstellers befolgt. Nach erfolgreicher Isolierung wurde die gDNA mittels PCR amplifiziert. Dafür wurden spezielle Primer verwendet: NEO, EXON3 und Intron2[158]. Die Sequenzen sind Kapitel 2.4 zu entnehmen. Die Auswertung des Amplifikats erfolgte durch Gelelektrophorese mit einem Agarosegel (1% in TAE-Puffer) bei 110 V für 50min. Danach wurde das Ergebnis fotografisch festgehalten.

3.1.4 Ermittlung der Genotypen

Nach erfolgreicher Genotypisierung aller Zuchttiere und der nachfolgenden Auswertung des PCR-Amplifikats durch Gelelektrophorese wurde das Ergebnis fotografisch festgehalten (Abbildung 3.1 A/B). Anhand der Amplifikatlänge und der Bandenanzahl konnte der Genotyp der Mäuse klar definiert werden.

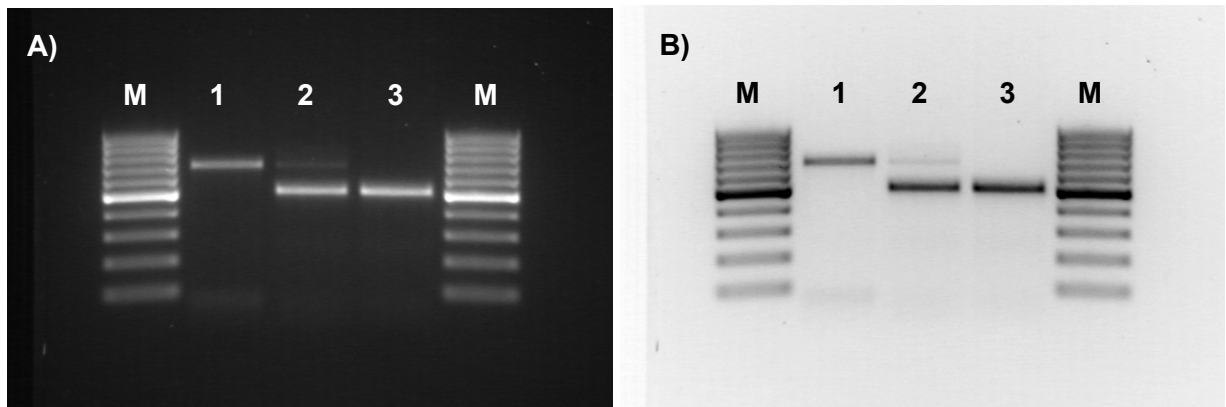


Abbildung 3.1: Darstellung der Genotypisierung. M = Marker; Bande 1 $ER\beta^{-/-}$; Bande 2 Heterozygot; Bande 3 Wildtyp; B) zeigt die inverse Darstellung.

Eine Amplifikatlänge von 500bp (Intron2 und Neo Primer) wurde dem Genotyp der homozygoten $ER\beta^{-/-}$ zugeordnet (Bande 1). Die Amplifikatlänge von 665bp (Intron2 und Exon3 Primer) entsprachen dem Genotyp der homozygoten Wildtyp Mäuse (Bande 3). Das Auftreten zweier Amplifikate konnte heterozygoten Mäusen zugeordnet werden (Bande 2).

Nach Feststellung des Genotyps gingen die Tiere wie unter 3.1.5 beschrieben in den Tierversuch ein. Nach erfolgreicher Intervention wurden im Weiteren die Organdaten festgehalten, um morphologische Veränderungen während der Hypertrophieentwicklung dokumentieren zu können.

3.1.5 Studiendesign

Die Tiere wurden nach Geschlecht und Genotyp unterschieden und vor Versuchsbeginn randomisiert und in folgende Gruppen aufgeteilt (Tab. 3.1.). Die Gruppeneinteilung sowie die Tierzahlen sind Tabelle 3.2 zu entnehmen. Als Versuchsbeginn wurde ein Alter von neun bis zehn Wochen und ein Körpergewicht zwischen 18 und 25g festgelegt. Um die Entwicklung einer artifiziell induzierten, pathologischen kardialen Hypertrophie, den Krankheitsverlauf sowie die damit verbundenen kardialen Veränderungen charakterisieren und dokumentieren zu können, wurden zwei Beobachtungszeiträume gewählt: zwei und

neun Wochen nach der jeweiligen Intervention. Es sind somit jeweils acht Gruppen pro Zeitpunkt untersucht worden.

Tabelle 3.1: Gruppenbezeichnung

Gruppenbezeichnung	Genotyp	Interventionen
Gruppe 1/2	WT	scheinoperiert (Sham)
Gruppe 3/4	WT	Aortenkonstriktion (TAC)
Gruppe 5/6	ERβ^{-/-}	scheinoperiert (Sham)
Gruppe 7/8	ERβ^{-/-}	Aortenkonstriktion (TAC)

Die Gruppengröße unterschied sich, da in der Versuchsplanung eine höhere postoperative Mortalität in den TAC-Gruppen erwartet wurde. Diese ist allerdings in der Versuchsdurchführung nicht eingetreten. Die Mortalitätsrate betrug 10-15%.

Tabelle 3.2: Anzahl der Tiere und Design der Gruppen

	Männliche Tiere		Weibliche Tiere	
	2 Wochen (n)	9 Wochen (n)	2 Wochen (n)	9 Wochen (n)
WT Sham	12	12	12	12
WT TAC	18	18	18	18
ERβ^{-/-} Sham	12	12	12	12
ERβ^{-/-} TAC	18	18	18	18

Zum Zeitpunkt d0 erfolgte die Induktion der kardialen Hypertrophie durch einen operativen Eingriff, der transversalen Aortenkonstriktion (TAC). Nach 13 Tagen erfolgte für die „Zwei-Wochen-Tiere“ eine echokardiografische Untersuchung. Nach exakt zwei Wochen wurden die Tiere getötet. Die „Neun-Wochen-Tiere“ wurden nach Induktion der Hypertrophie bis zum Tötungszeitpunkt nach zwei, drei, vier, sechs und neun Wochen echokardiografisch kontrolliert. Die zeitliche Abfolge der Interventionen ist in nachfolgender Abbildung 3.2 dargestellt.

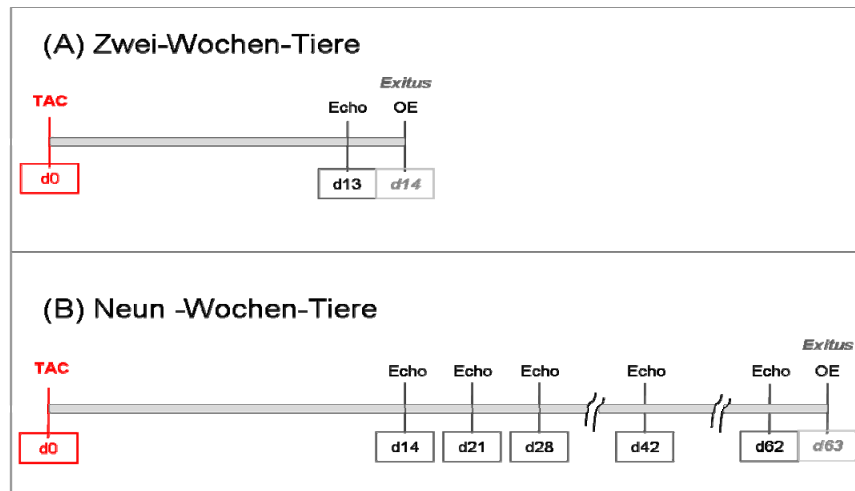


Abbildung 3.2: Zeitliche Abfolge der Interventionen. A) zeigt den zeitlichen Versuchsablauf für den Beobachtungszeitraum von zwei Wochen. B) zeigt den zeitlichen Versuchsablauf für den Beobachtungszeitraum von neun Wochen. Echo- Echokardiographische Messung; TAC- Transversale Aortenkonstriktion; Exitus- Tötung; OE- Organentnahme; d-Tag post-operativ)

3.1.6 Induktion der Hypertrophie durch Transversale Aortenkonstriktion (TAC)

Die transversale Aortenkonstriktion (TAC) ist eine Operationsmethode zur Induktion einer kardialen Hypertrophie im Tiermodell. Es wird eine Ligatur um den Aortenbogen zwischen dem Truncus brachiocephalicus und der Aorta carotis communis sinistra gelegt (Abbildung 3.3, Abbildung 3.4). Diese artifiziell erzeugte Aortenkonstriktion ist ein anerkanntes publiziertes Modell der Aortenstenose [160,161]

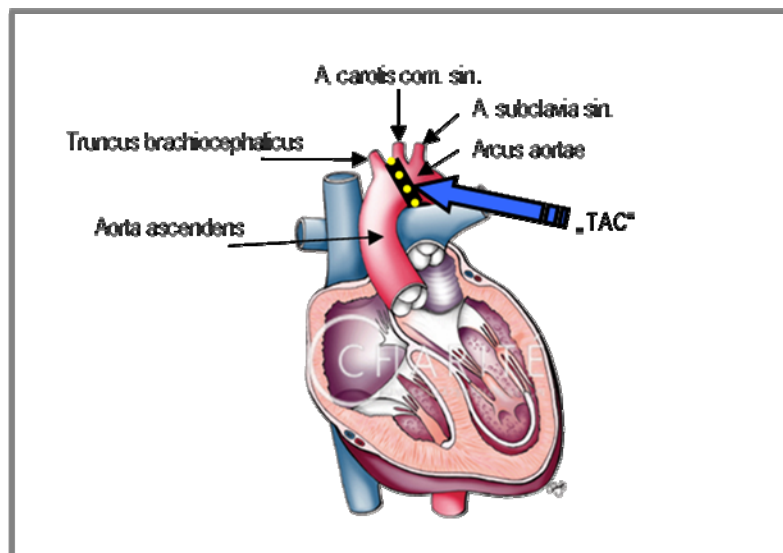


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der transversalen Aortenkonstriktion (TAC). Der blaue Pfeil zeigt die Position, an der die TAC durchgeführt wurde.

Für diese Operation wurden die Mäuse mit 1mg/ml pro kg Körpergewicht Ketamin/Xylasine anästhesiert. Anschließend wurden die Tiere endotracheal mit einem Plastiktubus (22G Venenverweilkatheter) intubiert und mit einem Atemzugvolumen von 200µl Raumluft und einer Respirationsrate von 200 Atemzügen pro Minute beatmet.

Nach erfolgter Sternotomie wurde der Aortenbogen exponiert (Abbildung 3.4 A). Die transversale Aorta wurde zwischen den Carotiden isoliert und mit einer 6.0 Seidennaht ligiert, die gegen eine 26-Gauge Nadel gezogen wurde (Abbildung 3.4 B und C).

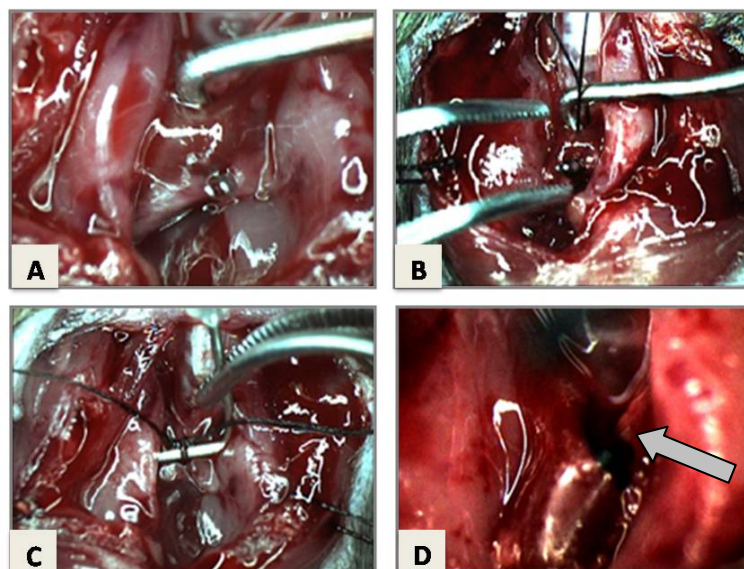


Abbildung 3.4: Fotografische Dokumentation einer TAC-Operation. Die Bilder A-D dokumentieren die OP-Technik. Abb. 3.3A zeigt die Exponierung des Aortenbogens mittels eines speziell angefertigten Hakens. Abb. 3.3B mit diesem eingekerbten Haken ist es möglich, den Seidenfaden um die Aorta zu legen. Abb. 3.3C Der Seidenfaden wird um die Aorta und die Gauge- Nadel geführt und fest zugezogen. Abb.3.3D zeigt die Ligatur um den Aortenbogen (grauer Pfeil).

Die Gauge- Nadel wurde nach der Ligation sofort entfernt und ermöglichte somit eine konstante Konstriktion von 0,4mm Aortendurchmesser (Abbildung 3.4 D). Der Thorax wurde mit einer 6.0 Seidennaht verschlossen. Das Bauchfell wurde anschließend mit einem 6.0 Polyestherfaden zugenäht. Die Operationsdauer betrug ca. 20min. Nach Operationsende wurden die Tiere mit Rimadyl (5mg/kg KG) analgetisch für 72h versorgt. Bis zum Erwachen aus der Narkose wurden die Tiere beobachtet und zur Erhaltung der Körpertemperatur mit einer Rotlichtlampe gewärmt.

3.1.7 Schein OP (Sham)

Die scheinooperierten Tiere (Sham) durchlaufen dieselben präoperativen Maßnahmen, Narkotisierung und Sternotomie, wie die Tiere mit TAC. Die Operationsprozedur erfolgt jedoch ohne Konstriktion der Aorta. Der operative Verschluss und die anschließende Analgesie und Nachsorge erfolgten wie in Kapitel 3.1.5 beschrieben.

Nach der Intervention wurden die Tiere wie in 3.1.7 beschrieben echokardiographisch charakterisiert. Nach zwei und neun Wochen wurden diese mit anschließender Organentnahme getötet. Die entnommenen Organe wurden sofort in flüssigem Stickstoff schock- gefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Des Weiteren wurden zusätzlich operierte Tiere neun Wochen nach dem operativen Eingriff hämodynamisch (Kapitel 3.1.8) charakterisiert.

3.1.8 Echokardiographie

Das Ausmaß der Hypertrophie wird morphologisch (Herzgewicht, Körpergewicht, Tibialängen), echokardiographisch (Wanddicken) und hämodynamisch (linksventrikuläre Drücke) bestimmt. Aus den echokardiographischen und hämodynamischen Messungen soll ein Bezug zur Funktion hergestellt werden (z.B. FS; EF; dp/dt_{max} und dp/dt_{min}).

Die echokardiographischen Untersuchungen sind Gegenstand der medizinischen Doktorarbeit von Cand. Med. Adam Penkalla, die in Zusammenhang mit der vorliegenden Doktorarbeit entstanden sind.

Durch das echokardiografische Monitoring war es möglich, die Hypertrophieentwicklung zu genau dokumentieren. Für die zweidimensionale Echokardiographie wurden die Tiere mit 1,5% Isofluran anästhesiert. Die Herzschlagfrequenz der zu untersuchenden Tiere betrug >400 Schläge pro Minute. Die zweidimensionale Echokardiographie wurde mit einem Echogerät (VisualSonics Vevo 770), das mit einem Transducer (25-35 MHz) speziell für Kleintiere ausgerüstet ist, durchgeführt. Die Darstellung des Herzens erfolgte im zweidimensionalen Modus in der parasternalen Kurzachsenansicht. Aus dieser Einstellung wurde ein M-Mode-Strahl senkrecht auf das Septum und die Hinterwand gerichtet (Abbildung 3.5, Abbildung 3.7, Abbildung 3.8). Die Messungen wurden auf Höhe des Papillarmuskels durchgeführt. Es wurde ein M-Mode-Echokardiogramm erstellt und spezifische Parameter bestimmt und berechnet.

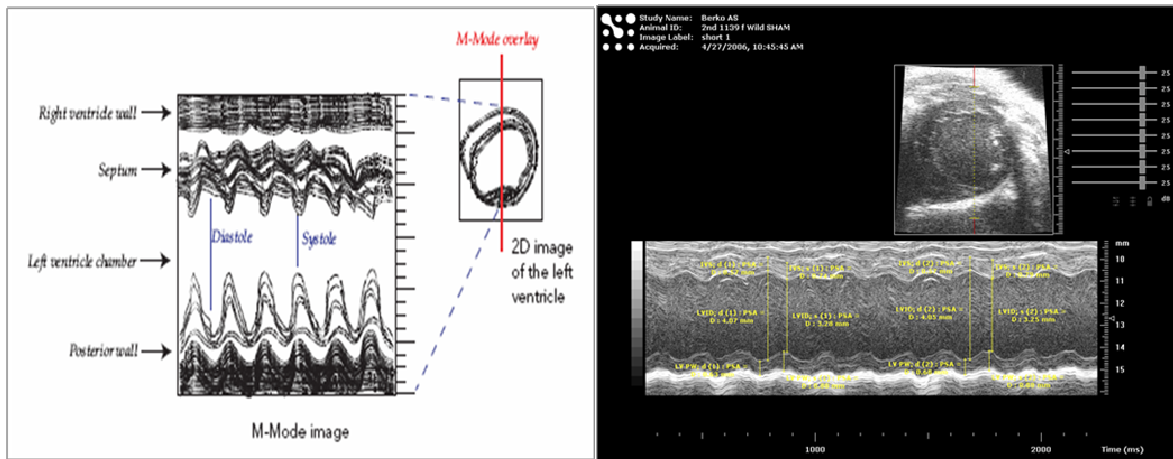


Abbildung 3.5: M-Mode Darstellung. Linkes Bild nach VisualSonics Vevo 770 Operator Manual. Rechtes Bild M-Mode Aufnahme während einer echokardiografischen Untersuchung.

Folgende Parameter wurden bestimmt und mit angegebener Formel kalkuliert.

- diastolische und systolische Wanddicke (PW);
- linksventrikulärer enddiastolischer Diameter (LVIDd)
- endsystolischer Diameter (LVIDs).
- Septumdicken (IVS)
- LV- Masse (LVM)
- Ejektionsfraktion (EF)
- Dilatationskoeffizient (Th/r)

Diese Parameter wurden für die Systole sowie für die Diastole bestimmt (Abbildung 3.7, Abbildung 3.8). Aus diesen gemessenen Parametern wurden im Folgenden die linksventrikuläre Masse und die Ejektionsfraktion kalkuliert.

Die linksventrikuläre Muskelmasse (LVM) wurde aus den im M- Mode gemessenen Parametern nach der Penn- cube Formel[162,163] wie folgt berechnet:

$$LVM = 1,05 ((LVIDd + LVPWd + IVSd)^3 - LVIDd^3).$$

Die Ejektionsfraktion (EF) gibt Auskunft über die systolische Funktion des Herzens. Die EF ist die prozentuale Auswurfsfraktion vom maximalen, also dem enddiastolischen Volumen des linken Ventrikels und wurde nach folgender Formel kalkuliert:

$$EF = ((LV_{Vold} - LV_{Vols}) / (LV_{Vold}) * 100).$$

Der Dilatationsindex (Th/r) gibt Information über die Hypertrophieform. Ein Th/R Quotient von 0,33 gilt als physiologisch. Höhere Werte werden bei Patienten mit kompensierter

Hypertrophie gefunden. Sinken diese Werte, so liegt eine exzentrische Hypertrophie vor. Dieser wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\underline{Th/r = (2 * PWd / LVIDd) [18,164]}$$

Um die Entwicklung der kardialen Hypertrophie genau kontrollieren und determinieren zu können, wurden die Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten echokardiographisch untersucht. Diese betrug postoperativ zwei, drei, vier, sechs und neun Wochen. In Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8 wurden exemplarisch für jede der untersuchten Gruppen die echokardiographischen Aufnahmen im M- Mode Echokardiogramm dargestellt.

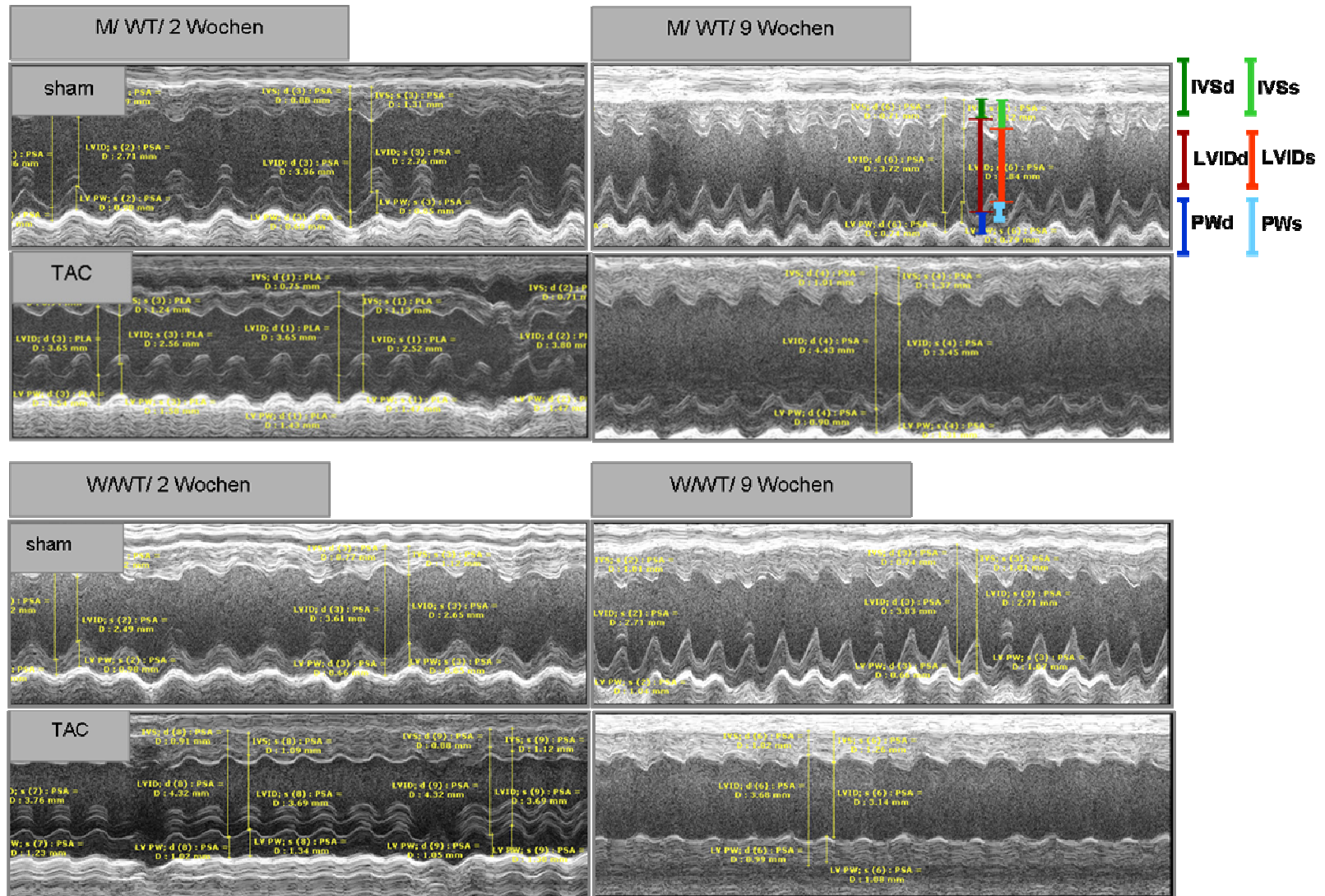
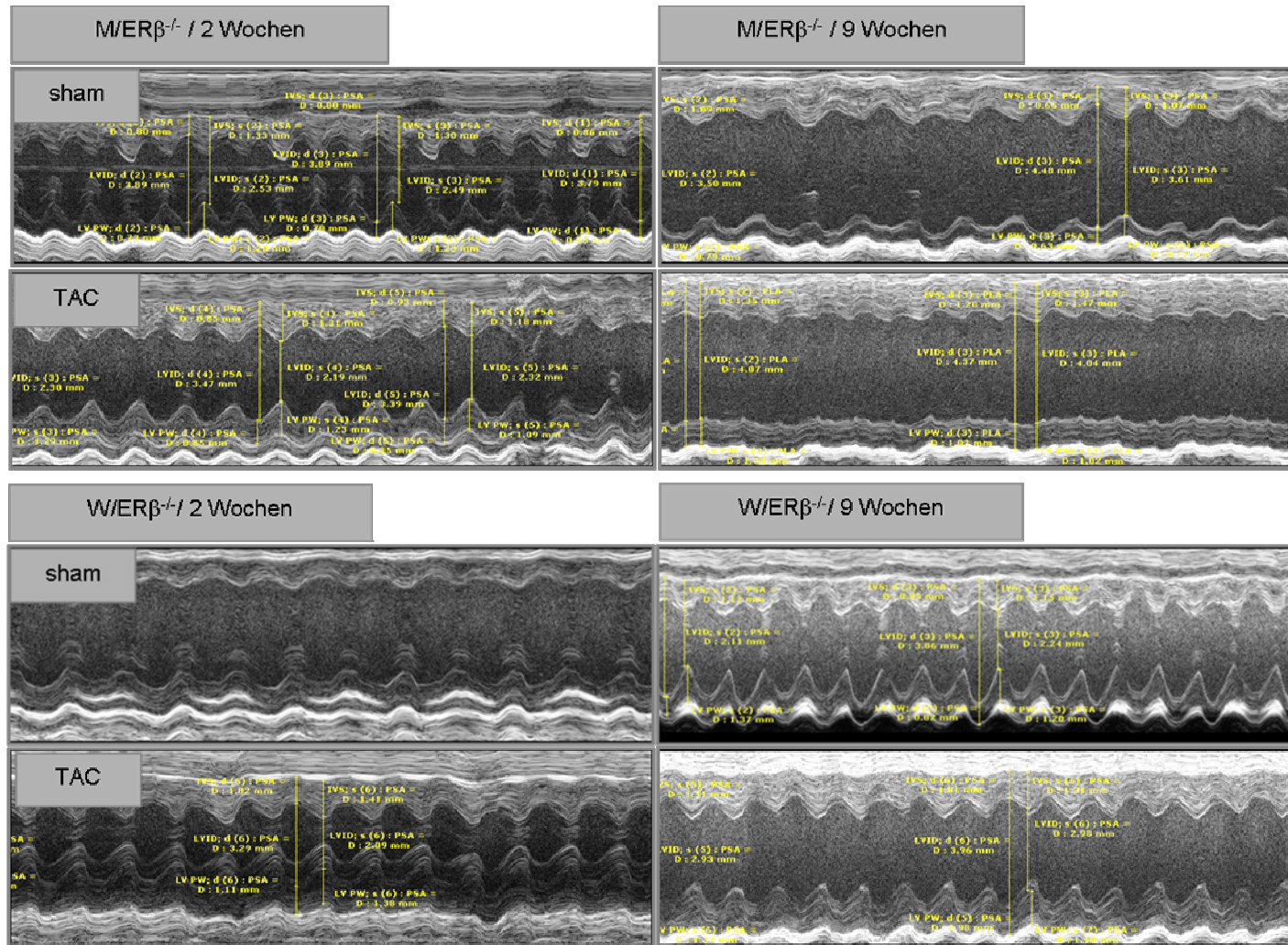


Abbildung 3.7: Exemplarische Darstellung der echokardiografischen Aufnahme im M-Mode aller WT-Tiergruppen.

Abbildung 3.8: Exemplarische Darstellung der echokardiografischen Aufnahme im M-Mode aller $ER\beta^{-/-}$ -Tiergruppen.

3.1.9 Hämodynamische Messungen

Die Herzkatheterisierung ist eine Methode zur Untersuchung des Herz- Kreislauf- Systems. Die Messung erforderte einen invasiven Eingriff zur linksventrikulären Blutdruckbestimmung. Diese hämodynamische Charakterisierung ermöglichte die Beschreibung der systolischen und diastolischen Funktion des Herzens. Eine gewisse Anzahl an Parametern stand durch diese Analyse zur Verfügung und ließ so Rückschlüsse auf die kardiale Funktion zu.

Für die kardiodynamische Charakterisierung wurden zusätzlich 80 Tiere operiert. Die Gruppeneinteilung ist dem Versuchsdesign in Tabelle 3. zu entnehmen. Hierfür wurde nur der Beobachtungszeitraum neun Wochen postoperativ ausgewählt. Die Versuchstiere durchliefen die gleiche Operationsprozedur (siehe Kapitel 3.1.6 sowie 3.1.7) und wurden nach neun Wochen hämodynamisch charakterisiert (Abbildung 3.9).

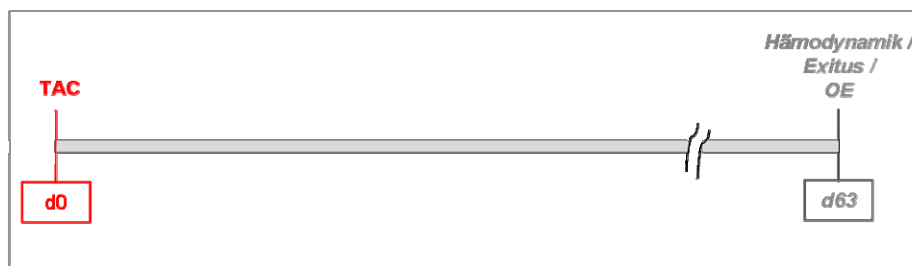


Abbildung 3.9: Zeitliche Abfolge der Hämodynamischen Messung. TAC-Transversale Aortenkonstriktion; Exitus-Tötung; OE-Organentnahme; d-Tage.

Zur Induktion der Narkose wurde Thiopental (Trapanal) verwendet. Hierbei wurden 125 µg/kg KG intraperitoneal gespritzt. Zur Überprüfung der Narkosetiefe wurde ein Schmerzreiz (Zwischenzehenreflex) gesetzt und die Dosis bei Bedarf um 10% erhöht. Zur Intubation wurde die Maus in Rückenlage (dorsal) fixiert und der Hals überstreckt. Danach wurde unter visueller Kontrolle ein Plastiktubus (22G Venenverweilkatheter) in die Trachea geschoben und das Tier kontrolliert ventiliert (Mouse Minivent, Hugo Sachs, Deutschland). Die Ventilation mit Raumluft wurde mit einem Hubvolumen von 8 µl/g KG und 200- 300 Zügen pro Minute durchgeführt. Der Erfolg der Intubation wurde durch visuelle Kontrolle der Thoraxbewegung kontrolliert.

Es wurde ein Hautschnitt in Längsrichtung von kaudal nach kranial durchgeführt und sowohl die Halsmuskulatur als auch die Speicheldrüse durchtrennt, wobei ein Blutverlust konsequent vermieden wurde. Eventuelle Blutungen wurden koaguliert. Die rechte Arteria carotis communis wurde dargestellt und sowohl proximal als auch distal Blutsperrern angelegt. Mit Mikroinstrumentarium wurde der Millar TIP-Katheter (1.4F) in das Gefäß

eingbracht, anschließend retrograd über die Aortenklappe in den linken Ventrikel eingeführt und durch ständige Kontrolle der Druckkurve optimal platziert. Der Katheter war an eine Transducer- Einheit angeschlossen, über die man die Eichung des Katheters vornehmen konnte. Das Messsignal wurde an eine Verstärkereinheit (*Föhr Medical Instruments®*) weitergeleitet, gelangte dann in einen Messwandler (*PowerLab®*) und zuletzt wurde die direkte Darstellung auf dem Monitor ermöglicht (Abbildung 3.10).

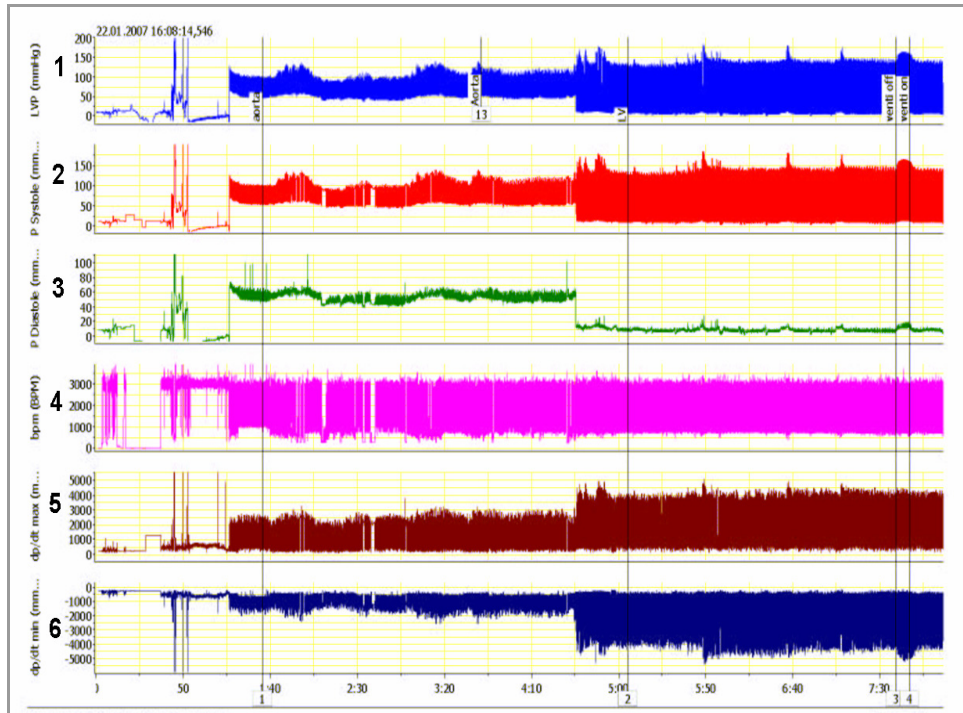


Abbildung 3.10: Darstellung der Hämodynamik Messung auf dem Monitor. Die Zahlen 1-6 geben die gemessenen Parameter an und lassen über den Monitor eine ständige Kontrolle zu. 1 und 2 geben den systolischen Druck in mmHg an; 3 zeigt den diastolischen Druck in mmHg; 4 gibt die Herzfrequenz in bpm an; 5 zeigt die Druckanstiegsgeschwindigkeit in mmHg/s, während 6 die Druckabfallsgeschwindigkeit in mmHg/s darstellt.

Die Software des *PowerLab- Systems® (Chart® 5.0)*, mit der die Dokumentation und Auswertung der Daten erfolgte, errechnete aus der oben genannten Druckschwankung in Abhängigkeit von der Zeit folgende Parameter:

- Herzfrequenz (HF),
- linksventrikulären systolischen Druck (LVP),
- enddiastolischen Druck (LVEDP),
- Druckanstiegs- und -abfallgeschwindigkeit (dP/dt max und dP/dt min)

Diese Parameter dienen als Maß für die linksventrikuläre Kontraktilität bzw. Relaxation (Abbildung 3.11). Alle Parameter wurden für jedes Tier einzeln für einen Zeitraum von

einigen Minuten parallel und in Echtzeit aufgezeichnet. Die hämodynamischen Daten wurden während einer kurzen Apnoe aufgenommen, um eine Beeinflussung durch die Beatmung auszuschließen.

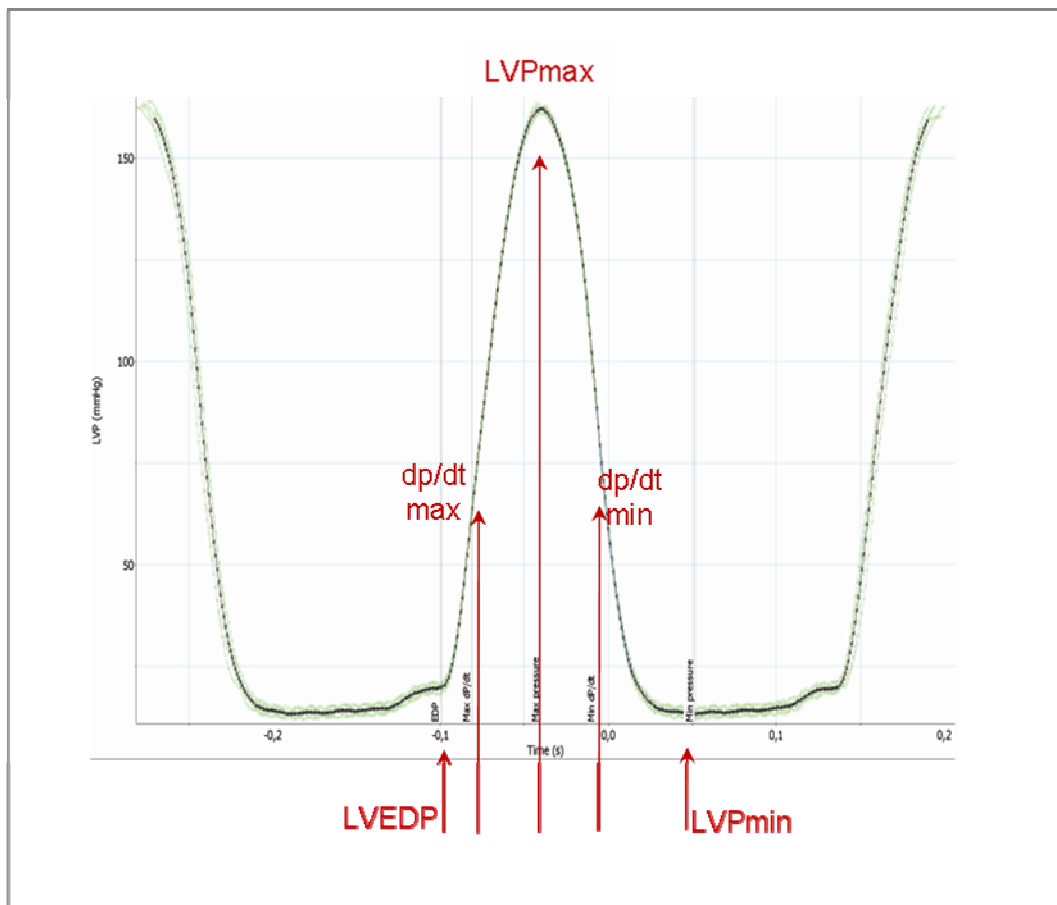


Abbildung 3.11: Darstellung einer Druckkurve mit den gemessenen Parametern.

Maximaler linksventrikulärer Druck (LVP max. mmHg): Der maximale linksventrikuläre Druck ist der höchste gemessene Druck im linken Ventrikel und daher ein Parameter der systolischen Herzfunktion. Der maximale linksventrikuläre Druck wird in mmHg angegeben.

Minimaler linksventrikulärer Druck (LVP min. mmHg): Der minimale linksventrikuläre Druck ist der niedrigste gemessene Druck im linken Ventrikel und daher ein Parameter der frühen diastolischen Herzfunktion. Der minimale linksventrikuläre Druck wird in mmHg angegeben.

Linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt max mmHg/s): Die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ist ein Parameter der systolischen Funktion und insbesondere der Kontraktilität des linken Ventrikels. Diese wird aus der Ersten Ableitung der linksventrikulären Druckkurve errechnet und stellt daher die

Geschwindigkeit der Veränderungen des Drucks im Ventrikel da und wird durch die Einheit mmHg/s beschrieben.

Linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit (dp/dt min mmHg/s): Die minimale Druckabfallsgeschwindigkeit ist ein Parameter der frühen diastolischen Relaxation. Er wird analog zur maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit aus der ersten Ableitung der Druckkurve errechnet und in mmHg/s angegeben.

Linksventrikulärer enddiastolischer Druck (LVEDP mmHg): Der linksventrikuläre enddiastolische Druck ist einer der wichtigsten konventionellen Parameter der diastolischen Funktion. Er ist der Druck, der am Ende der Diastole kurz vor Beginn der systolischen Kontraktion im linken Ventrikel gemessen wird.

Herzfrequenz (HF bpm): Die Herzfrequenz gibt die Herzschläge pro Minute an.

Zu Beginn jeder Messung wurde das *PowerLab*[®]- System nach Vorgabe des Herstellers durch eine Zwei- Punkt- Eichung kalibriert. Dazu waren zwei Durchgänge nötig. Zunächst wurde das Messsignal überprüft, dass von der Transducer- Einheit an den Computer gesendet wird. Dazu stellte man an der Transducer- Einheit die Werte 0mmHg und 100mmHg ein und verglich diese mit den im Programm *Chart 5*[®] angezeigten Messwerten. Dann wurde das Messsignal des TIP- Katheters kalibriert. Hierfür wurde die Spitze des Katheters in einen mit Wasser gefüllten Messzylinder überführt und kurz unter den Oberflächenspiegel gehalten, was einem Druck von 0mmHg entspricht. Anschließend wurde die Spitze in die Tiefe gehalten, die einem Druck von 21mmHg entspricht. Bei beiden Vorgängen wurde der entsprechende Druckwert auf dem Bildschirm abgelesen und gegebenenfalls an der Transducer- Einheit bzw. am *PowerLab*[®] korrigiert.

3.1.10 Organentnahme

Vor der Organentnahme wurde zunächst das aktuelle Körpergewicht der Maus bestimmt. Danach wurde die Maus mit Isofluran betäubt und anschließend mit einem Kehlschnitt getötet.

Um das Herz-/Lungenpaket zu exzidieren, wurde die Maus auf den Rücken gelegt und kaudal an der Spitze des Sternums aufgeschnitten. Danach erfolgte ein horizontaler Schnitt unterhalb des Thorax bis hin zu den Flanken. Außen an den Flanken erfolgten links und rechts vertikale Schnitte nach cranial bis zu den Schlüsselbeinen. Das Herz-/Lungenpaket wurde mit der Pinzette fixiert und von den zu- und abführenden Gefäßen getrennt. Anschließend konnten Herz und Lunge voneinander getrennt werden. Herz und Lungen wurden sorgsam und zügig von Fett- und Mediastinalgewebe befreit. Das Herz wurde bis zur Präparation in kalten PBS-Puffer gelegt.

Das Herz wurde mit einer Pinzette aus dem PBS-Puffer genommen und es erfolgte die Präparation. Die Vorhöfe wurden sauber abgeschnitten und entsorgt. Anschließend wurde das Herz kurz mit Zellulosepapier trocken getupft und das Herzgewicht bestimmt. Die Herzspitze wurde abgeschnitten, danach erfolgte ein Querschnitt von 1-2 mm Dicke für immunhistologische Untersuchungen. Dieses Gewebestück wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in Tissue Tek (Kryoschnitte) eingebettet. Anschließend wurden linker und rechter Ventrikel und das Septum frei präpariert. Die Gewebestücke wurden in die bereit gestellten Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die linken Ventrikel der Tiere, die hämodynamisch charakterisiert worden sind, wurden in 4%igem Formaldehyd fixiert. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass diese invasive Messung einen möglichen Einfluss auf die RNA-Expression haben könnte. Deshalb wurden diese Herzen nur für histologische Untersuchungen genutzt.

Um eine eventuell vorliegende Ödembildung zu ermitteln, wurde das Lungengewicht feucht und im getrockneten Zustand (nach 24h Lufttrocknung) bestimmt. Für die Entfernung der Leber wurde die Bauchdecke weiter aufgeschnitten, um die inneren Organe freizulegen. Um die Leber entnehmen zu können, wurden zuführende und abführende Gefäße, wie Vena Cava, Vena Portae, Arteriae Hepaticae, durchtrennt. Die Nach dem Entfernen der Gallenblase wurde das Lebergewicht bestimmt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung der RNA aus Myokardgewebe

Für die Isolierung der RNA wurden nur die linken Ventrikel der Herzen verwendet. Die Gesamt-RNA von jeweils 10-30µg des linken Ventrikels wurde nach Anweisung des Herstellers mit „RNAzol B“ extrahiert.

Dazu wurden die gefrorenen Gewebestücke mechanisch mit Lysis Matrix D Keramikkügelchen zerkleinert, gewogen und jeweils in 600µl RNAzol B aufgenommen. Es folgte eine 20s dauernde elektrische Homogenisierung (FastPrep 120, Thermosavant). Anschließend wurden die Proben mit 400µl RNAzol B auf ein Gesamtvolumen von 1ml aufgefüllt. Die Proben wurden für 5min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben für 30min bei 4°C stark geschüttelt. Den Proben wurde 0,2ml Chloroform pro 1ml Homogenat hinzugefügt. Sie wurden für 2min gevortext und anschließend für 5min auf Eis gestellt. Es folgte eine Zentrifugation für 10min bei 19.000g und bei 4°C. Der Überstand mit der darin gelösten RNA wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die RNA-Fällung wurde das zum Überstand äquivalente Volumen an eiskaltem Isopropanol hinzugefügt. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben über Nacht bei -20°C gefällt.

Die Proben wurden am nächsten Tag bei 4°C für 30min bei 19.000g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert. Das RNA- Pellet wurde zweimal mit 80% Ethanol gewaschen und anschließend für 20min bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Das RNA- Pellet wurde je nach Größe in 25-50µl DEPC-H₂O aufgenommen und bei -80°C gelagert.

3.2.2 Überprüfung der RNA-Qualität

Die RNA-Qualität und -Konzentration wurde mit dem „2100 Bioanalyzer“ überprüft. Das Messprinzip dieses Gerätes beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung nach Größe der RNA in einer Kapillare („lab on a chip“) mit photometrischer Detektion. Zur Beurteilung der RNA-Qualität diente das Verhältnis 28S/18S der rRNA- Banden sowie die so genannte RNA *Integrity Number* (RIN). In der RIN werden neben dem Verhältnis 28S/18S der rRNA- Banden weitere Qualitätsmerkmale wie Anomalien in der 5S-Region oder der Basislinie zusammengefasst. Sie kann Werte zwischen 0 und 10 annehmen (Abbildung 3.12). Alle Messungen wurden mit dem „RNA 6000 Nano Reagents & Supplies Kit“ sowie dem „RNA 6000 Ladder“ als Größen- und Konzentrationsstandard durchgeführt.

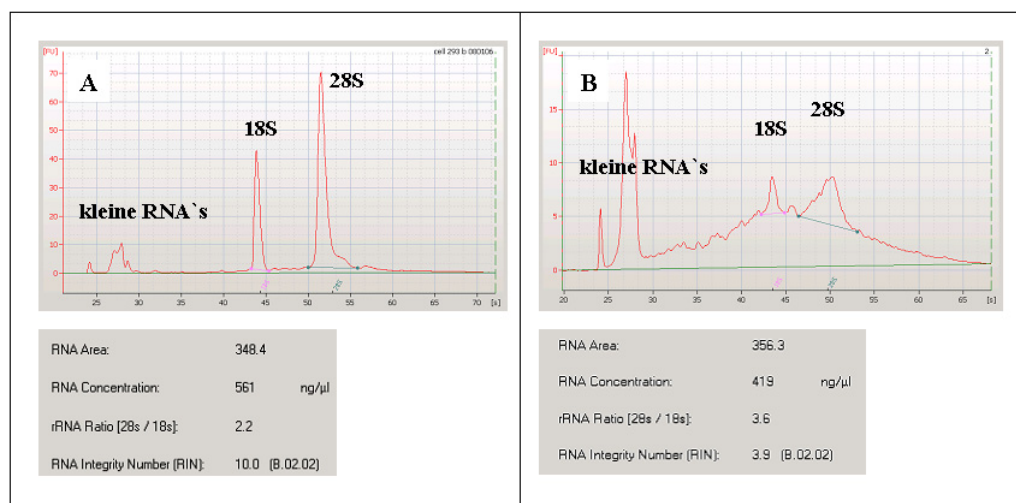


Abbildung 3.12: Elektropherogramme zweier unterschiedlicher RNA Populationen. Die RNA-Qualität wird charakterisiert durch das 28S/18S rRNA Ratio, welches idealerweise bei ~2.0 liegt, und einer "RNA Integrity Number" (RIN), die idealerweise bei 10.0 liegt (A). Beginnende Degradation der RNA führt zu einer Abnahme des 28S/18S Ratio bzw. nicht mehr sinnvollen Werten und kleineren RIN (B).

Nach der Bestimmung der RNA-Qualität und der RNA-Konzentration wurde die RNA in cDNA umgeschrieben (siehe 3.2.3).

3.2.3 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription ermöglicht die Umschreibung von RNA in komplementäre cDNA. Für die cDNA- Synthese wurden die RNA-Proben zunächst auf 125ng/µl verdünnt.

Als Negativkontrolle wurde für jede cDNA- Synthese eine Probe mit H₂O mitgeführt. Es wurden 500ng RNA für die Reaktion eingesetzt. Das Volumen wurde mit DEPC-H₂O auf 10µl aufgefüllt und 2µl Random- Primer (300ng/µl) hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 10min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Danach wurden 9µl Master-Mix hinzu gegeben.

pro Probe: 4µl 5x Puffer,
 2µl DTT,
 1µl RNasin,
 1µl dNTP,
 1µl Superscript II; Reverse Transkriptase.

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt, kurz zentrifugiert, zunächst für 10min bei Raumtemperatur und anschließend für 1h bei 42°C inkubiert. Für die Inaktivierung der Enzymreaktion wurde das Gemisch für 5min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch auf Eis heruntergekühlt. Die cDNA wurde im Anschluss auf 5ng/µl verdünnt, aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.4 Quantitative Real Time-PCR

Für die Messungen ausgewählter Gene wurde eine Real-Time-PCR in doppeltem Ansatz durchgeführt. Dafür wurde der *Power SYBR® Green PCR Master Mix* nach Herstellerangabe verwendet. Die cDNA wurde für die neun Wochen Tiere auf 2ng/µl verdünnt, während die cDNA der zwei Wochen Tiere wegen Template-Inhibierung auf 0,4ng/µl verdünnt worden sind. Mit folgendem Master-Mix (Tabelle 3.2) wurden die Proben für die Real-Time-PCR auf Eis in 96-Lochplatten pipettiert. Die eingesetzte Primerkonzentration betrug jeweils 5pmol.

Tabelle 3.2: A) Zusammensetzung des Master Mix für die rt-PCR. B) Zusammensetzung des Power SYBR® Green PCR Master Mix

A)	B)
<u>Master Mix (1x)</u>	<u>Power SYBR® Green PCR Master</u>
Sybr Green MM 12,5 µl	Sybr Green Farbstoff
Primer (F/R) je 1µl	Taq Polymerase
Aqua dest. 5,5µl	dNTPs
Template (cDNA) 5µl	MgCl ₂
	Puffer
	Passive Referenz (ROX)

Die Probenansätze wurden bei 4°C in einer Plattenzentrifuge zentrifugiert. Im Anschluss wurde die Real-Time- PCR gestartet. Folgende Zyklusparameter wurden verwendet:

- Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten,
- 40 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für je 15 Sekunden
- Annealing (Anlagerung) der Primer
- Elongation (Strangsynthese) bei 60°C für eine Minute.

Die Primersuche wurde über das NCBI Internet-Portal durchgeführt. Die Primerauswahl erfolgte mit der Software der Firma, die Überprüfung der Sequenzen fand durch die Datenbank „NCBI Blast“ statt. Die Sequenzen für die Primerpaare sind Kapitel 2.4 zu entnehmen. Für die Überprüfung der Primerspezifität wurden die geeignete Annealing Temperatur und das Primer-Verhältnis mittels der Standardkurve bestehend aus dem gesamten Probenpool bestimmt. Alle Primerpaare wurden intronüberspannend ausgewählt, da nach der RNA-Isolierung kein DNA Verdau durchgeführt wurde und weiterhin die unspezifische Amplifikation von genomischer DNA verhindert werden sollte.

3.2.5 Quantifizierung der Real-Time- PCR

Die Quantifizierung der untersuchten Gene erfolgte mit der Berechnung mittels Standardkurve. Diese Form der Analyse ist eine relative Quantifizierungsmethode. Man benötigte eine interne Kontrolle, deren Signal verwendet wurde, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen. Dies wird als Normierung bezeichnet. Da die Gesamtanalyse aller zu untersuchenden Gene auf diesem Signal beruhte, sollte das Normierungsgen (Referenzgen) nicht reguliert sein. Als Referenzgene wurden HPRT, 18S und GAPDH herangezogen. Nach Analyse der Referenzgene erwies sich HPRT als geeignet, da hier die geringsten Schwankungen zu beobachten waren. Alle untersuchten Gene wurden somit auf HPRT normiert.

Es besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem so genannten Threshold-Cycle „Schwellenwert-Zyklus“ (CT). War die Ausgangsmenge bekannt, konnte eine Standardkurve durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen den CT konstruiert werden. Durch die Geradengleichung $x = (CT - b)/m$ konnte anhand der Standardkurve für jede unbekannte Probe der Logarithmus der Kopienzahl bestimmt werden. Alle Proben wurden normiert, indem die errechnete Kopienzahl des Zielgens durch die Kopienzahl des Referenzgens geteilt wird: $GEN \text{ (normiert)} = \text{Kopienzahl Zielgen} / \text{Kopienzahl Referenz}$. Nach der Quotientenbildung der einzelnen Proben konnten diese zwischen den verschiedenen Gruppen verglichen werden. Somit erhält man eine Aussage über die relative Expression in Bezug auf das Referenzgen innerhalb der untersuchten Tiergruppen.

3.3 Mikroarray-Technologie

3.3.1 Array-Format

Die eingesetzten Gene Chip Mouse Genome 430 2.0 Arrays wurden von Affymetrix (Santa Clara) hergestellt. Der Gene Chip Mouse Expression 430 2.0 Array erlaubt mit 45000 *probe set* die Analyse von 39000 Transkripten, bzw. 34000 charakterisierten Genen. Die *probe sets* bestanden aus elf *match* und elf *mismatch*- Oligonukleotiden, die durch lichtgerichtete in-situ-Synthese auf der Array-Oberfläche aufgebracht wurden (je 25mere). Diese Vielzahl an Oligonukleotiden und die *mismatch* (Austausch des mittleren Nukleotids)- Oligonukleotide zur Kontrolle der spezifischen Bindung waren auf Grund der geringen Länge der Oligonukleotide erforderlich. Die elf Oligonukleotide befanden sich im C-terminalen Bereich des jeweiligen Gens. Der Vorteil bestand darin, dass die Sondenherstellung auf Grund des OligoT7-dT(24)-Primers diese Region bevorzugte.

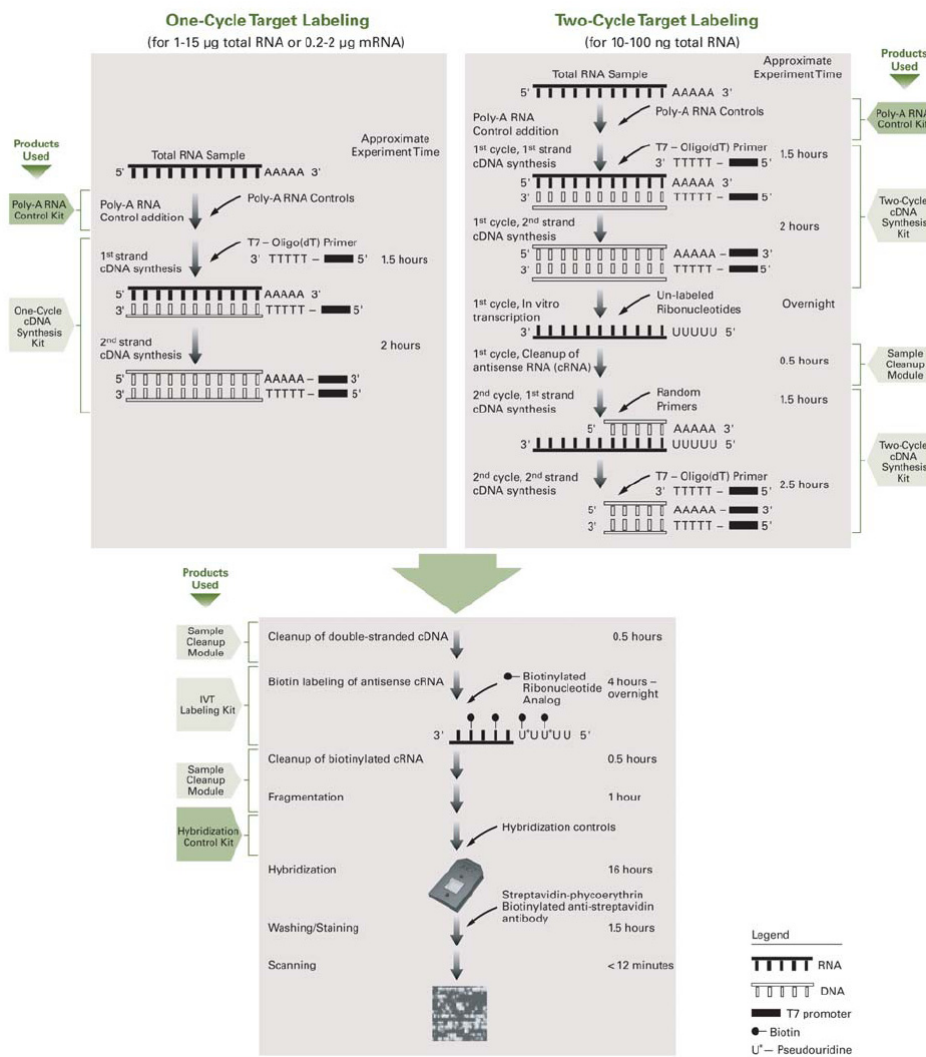


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung des GeneChip für ein eukaryotisches Labeling Assay für die Expressionsanalyse (nach Affymetrix).

Das Verhältnis der Signalintensitäten von 3'-gelegenen zu mehr 5'-gelegenen Oligonukleotiden war zudem ein Qualitätsmaß für die Integrität der eingesetzten Sonde. Partiiell degradierte RNA bzw. Sonde hätte zu einem starken Abfall der Signalintensitäten von 3'- zu 5' gelegenen Oligonukleotiden geführt und somit die Unbrauchbarkeit der Ergebnisse angezeigt. Für die Hybridisierungen wurde eine "Ein-Farben-Technologie" genutzt: In amplifizierte komplementäre RNA (cRNA) wurden biotinylierte Nukleotide eingebaut, die nach der Hybridisierung mit R-Phycoerythrin-Streptavidin und biotinylierten Anti-Streptavidin- Antikörpern angefärbt wurden. Folglich entstand als Ergebnis der Hybridisierung eine absolute Signalintensität.

3.3.2 Komplexe Hybridisierungen mit Affymetrix GeneChip Mikroarrays

Für die Hybridisierung mit dem GeneChip Mikroarray wurde eine Auswahl des Probenmaterials getroffen. Anhand der morphologischen Hypertrophieentwicklung und der mittleren Expression der Gene ANP, BNP und Myh7 wurde eine Auswahl der Tiere getroffen, deren Genexpressionen durch einen GeneChip Mikroarray untersucht werden sollen. Dafür wurden jeweils vier Tiere pro Gruppe ausgewählt. Demnach wurden 32 Mikroarrays hybridisiert. Es wurde ein Amplifikations- und Markierungsprotokoll mit einer Amplifikationsrunde eingesetzt. Zum Annealing wurden 1µg - 3µg Gesamt-RNA in H₂O mit 100pmol OligoT7-dT₍₂₄₎-Primer (Sequenz: 5'-GGC CAG TGA ATT GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGG CGG (dT)₂₄-3') in einem Volumen von 10µl für 10min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Zu dem Ansatz wurden zur Erststrangsynthese folgende Komponenten hinzu gegeben:

4µl	5 x Erststrang-Puffer
2µl	0,1M DTT
1µl	dNTPs (je 10mM)
1µl	35U/µl RNase-Inhibitor
2µl	200U/µl Superscript III

Der Ansatz wurde für 90min bei 43°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Ansatz für 10min bei 72°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Folgende Komponenten wurden für die Zweitstrangsynthese hinzu gegeben:

18µl	cDNA der Erststrangsynthese
92µl	H ₂ O
30µl	5x Zweitstrang-Puffer
3µl	dNTPs (je 10mM)
1µl	10U/µl E. coli Ligase
4µl	10U/µl E. coli DNA Polymerase I
2µl	2U/µl RNase H

Der Ansatz wurde für 2h bei 16°C inkubiert, dann wurden 2µl T4-DNA-Polymerase hinzu gegeben und für weitere 20min bei 16°C inkubiert. Durch Zugabe von 10µl 0,5M EDTA wurde die Reaktion abgebrochen.

Die Aufreinigung der doppelsträngigen DNA erfolgte durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)-Extraktion und anschließender Fällung mit Ammoniumacetat und Ethanol bei -20°C für 20min. Das getrocknete Pellet wurde in 12µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die Synthese der Biotin-markierten cRNA wurde mit dem GeneChip IVT Labeling Kit (Affymetrix 900449) durchgeführt. Die amplifizierte cRNA wurde mit dem RNeasy Kit der Firma Qiagen aufgereinigt. Die cRNA wurde fragmentiert und in ihrer Qualität und Quantität durch Messung im Bioanalyzer überprüft (siehe Kapitel 3.2.2). Die cRNA wurde im Hybridisierungspuffer der Firma Affymetrix aufgenommen und mit einer finalen Konzentration von 0,05µg/µl für 16h bei 45°C hybridisiert. Das Waschen der Arrays erfolgte in einer "GeneChip fluidics station" (Affymetrix) entsprechend Affymetrix Protokoll EukGE-WS2 mit Waschpuffern (s. 2.3) bei 50°C. Anschließend wurden die Arrays mit einem Affymetrix GeneChip System Confocal Scanner 3000 eingescannt.

3.3.3 Bildauswertung der Mikroarrays

Die Bildauswertung erfolgte mit der *Affymetrix GeneChip Operating Software* (GCOS). Diese fasste die jeweils elf Signalintensitäten der *match*-Oligonukleotide eines Gens zu einem Signal zusammen und berechnete mit Hilfe der *mismatch*- Oligonukleotide die Spezifität der Bindung (statistische Signifikanz).

3.3.4 Differentielle Genexpression

Die Identifikation von statistisch signifikanter Deregulation eines Gens in einem Array-Experiment ist mit zwei grundlegenden Problemen behaftet. Einer hohen Anzahl an parallelen statistischen Tests (bis zu 50.000 bei genomweiten Arrays) stehen eine häufig geringe Anzahl an biologischen wie technischen Replika (z.B. 2 x 4) gegenüber. Dieses so genannte "*multi-testing*"-Problem führt in erster Linie bei schwachen Signalintensitäten durch zufällige Variation zu statistischer Signifikanz und damit zu falsch-positiven Werten. Herkömmliche Korrekturansätze, wie die Bonferroni-Korrektur, liefern auf Grund der sehr hohen Replika-Anzahl keine befriedigenden Ergebnisse. In einem ersten Schritt wurden bei dem Affymetrix-Datensatz zur Reduktion des keine Information enthaltenden Hintergrundrauschens alle *probe sets* ohne "*present call*" in einem der Zustände entfernt. Mit der "*significance analysis of microarrays*" (SAM, Tusher et al)[165] wurde basierend auf den Array-Daten aller Proben eine globale Falsch-Positiv-Rate abgeschätzt.,

Bei der "*significance analysis of microarrays*" wurde durch den Vergleich einer berechneten statistischen Kenngröße bei richtiger Zuordnung der Signalintensitäten zu

den beiden zu analysierenden Zuständen (relative Differenz) im Vergleich zur zufälligen/frei permutierten Zuordnung (erwartete Differenz) die Signifikanz der veränderten Expression einer Probe bestimmt. Die relative Differenz $d_r(i)$ ergab sich aus:

$$d_r(i) = \frac{x_{i2} - x_{i1}}{s_i + s_0}$$

x_i : Mittelwert einer Gruppe von Signalintensitäten

s_i : Summe der Standardabweichungen der beiden Gruppen

s_0 : Korrekturwert zur Vermeidung zu kleiner/nicht sinnvoller s_i

Die erwartete Differenz $d_E(i)$ ergab sich aus dem Mittelwert diverser $d(i)$ bei frei permutierter Gruppenzuordnung der Signalintensitäten. Bei ähnlicher Expression eines Gens (i) in beiden zu vergleichenden Gruppen folgte $d_r(i) \approx d_E(i)$ und bei differentieller Expression $d_r(i) \neq d_E(i)$. Die frei wählbare Differenz beider statistischer Kenngrößen $\Delta d(i) = d_r(i) - d_E(i)$ war also der Grenzwert für die Definition der signifikanten veränderten Expression eines Gens.

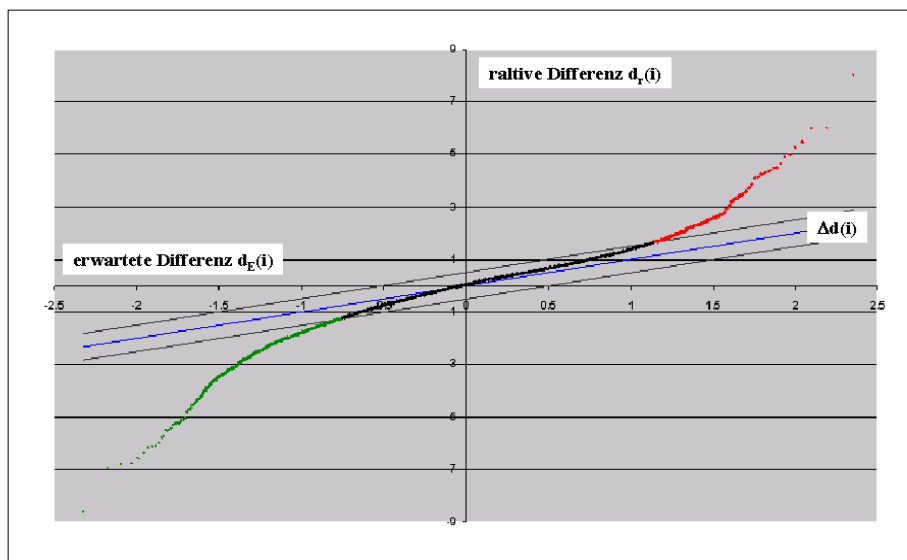


Abbildung 3.14: Bestimmung differentieller Genexpression durch permutationsbasierte statistische Verfahren. Die relative Differenz $d_r(i)$ bei richtiger Zuordnung der Signalintensitäten der Proben beim Vergleich zweier Zustände ist aufgetragen gegen die erwartete Differenz $d_E(i)$ bei frei permuierter Zuordnung der Signalintensitäten. Bei verstärkter Expression eines Gens ergibt sich $d_r(i) \gg d_E(i)$ (rote Punkte) und bei verminderter Expression $d_r(i) \ll d_E(i)$ (grüne Punkte). Ein gewählter Grenzwert für $\pm \Delta d(i)$ (schwarze Linien) definiert die deregulierten Proben.

Die freie Permutation aller Signalintensitäten einer Probe lieferte aber unter Umständen zufällig Kombinationen, die diesen Grenzwert hätten überschreiten können. Dies gestattete die Vorhersage einer Falsch-Positiv-Rate (q-Wert), die mit steigendem $\Delta d(i)$ abnahm (Abbildung 3.14).

3.3.5 ANOVA Test

Für die statistische Analyse der Mikroarrays zur Bestimmung der potentiellen Abhängigkeit von unterschiedlichen beeinflussenden Faktoren wurde die *Analysis of variance* (ANOVA) verwendet. Es wurde für beide Genotypen getrennt mittels 2-Faktor ANOVA auf Interaktion von Geschlecht (männlich und weiblich) und Hypertrophie (TAC und sham) von den Expressionswerten der *probe sets* getestet. Ein p-Wert von $<0,05$ wurde bei der Auswertung als statistisch signifikant bewertet.

3.3.6 Funktionelle Annotation von Gen-Gruppen mit DAVID, GO und KEGG

Zur Identifikation von *Geneontology* (GO)- Kategorien und KEGG Signalwegen mit einer statistisch signifikant erhöhten Anzahl an Genen von einem gegebenen Eingangsgensatz wurde DAVID (DAVID: *D*atabase for *A*nnotation, *V*isualization, and *I*ntegrated *D*iscovery; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genoms) eingesetzt. Bei GO wurden die Gene in drei baumartig strukturierte Annotationen bei den übergeordneten Themen "Biologischer Prozess", "Molekulare Funktion" und "Zelluläres Kompartiment" auf insgesamt fünf Ebenen einsortiert. Dieses ist mit Hilfe der Datenbank Geneontology (<http://www.geneontology.org/>) durchgeführt worden. Die erhaltene Anzahl an Genen für eine bestimmte GO-Kategorie oder Signalweg im Vergleich zur Größe des Eingangsdatensatzes wurde mit der entsprechenden Anzahl an Genen in der GO-Kategorie des gesamten Genoms im Vergleich zur Gesamtanzahl des Genoms verglichen. Ebenso wurde mit den KEGG Signalwegen verfahren. Mit einem exakten Fisher Test (2x2 Kreuztabelle) wurde die statistische Signifikanz berechnet.

3.3.7 Standardisierung und Veröffentlichung von Array-Datensätzen

Eine Vielzahl an unterschiedlichen statistischen Ansätzen zur Analyse von Array-Datensätzen wurde entwickelt, die leider teilweise zu recht unterschiedlichen Ergebnissen bei der Analyse eines identischen Datensatzes führen können. Damit eine Standardisierung und die Vergleichbarkeit von Array Experimenten erzielt werden kann, wurden in der Zusammenarbeit einer Vielzahl von Wissenschaftlern konkrete Richtlinien für die Durchführung von Array-Experimenten aufgestellt. Diese so genannten "Minimum information about a microarray experiment" (MIAME) [166]- Richtlinien zielen auf eine saubere Annotation des Experiments und des biologischen Materials ab und gliedern sich wie folgt:

a. Experimentelles Design

Annotation der hybridisierten Arrays (technische und biologische Replika)

b. Array-Design

Annotation aller Elemente (z.B. der Oligonukleotide) eines Arrays

c. Sondencharakterisierung

Exakte Beschreibung des biologischen Materials und der eingesetzten Methoden der RNA-/DNA-Isolation und Sondenmarkierung

d. Hybridisierung

Angabe der Hybridisierungsparameter (Puffer, Temperatur, Dauer, etc.)

e. Scannen und Bildanalyse

Angabe des Scanners und der Bildanalysesoftware

f. Normalisierung

Angabe des Algorithmus und gegebenenfalls der Software.

Verschiedene webbasierte Datenbanken, wie "Gene Expression Omnibus" (GEO) vom National Center for Biotechnology Information (NCBI) folgen diesen Richtlinien und gestatten die uneingeschränkte Verfügbarkeit von Array-Datensätze (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Diese beinhalten auch die unbearbeiteten Signalintensitäten direkt aus der Bildanalyse, so dass jeder interessierte Wissenschaftler diese Datensätze entsprechend seiner Fragestellung oder mit den von ihm bevorzugten Algorithmen bearbeiten kann.

3.4 Biochemische Methoden

3.4.1 Proteinisolierung und Proteinbestimmung

Aus myokardialen linksventrikulären Gewebestücken der Maus wurde Gesamtprotein isoliert und mit eiskaltem Proteinlysispuffer (s. Kapitel 2.3) versetzt. Die Proben wurden mittels Homogenisator (FastPrep 120, Thermosavant) für zweimal 20s mechanisch homogenisiert. Nach der Homogenisation wurde 10% SDS hinzu gegeben. Nach kurzem vortexen wurden die Proben für 20min auf Eis lysiert. Danach wurden die Proben kurz geschüttelt und bei 14.000rpm über 10min zentrifugiert. Eine eventuell bestehende Fettschicht wurde abgenommen und der wässrige Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dabei wurden 20µl überführt und der Rest bei -80°C gelagert.

Die Bestimmungen der Proteinkonzentration erfolgten mit dem „BCA-Protein- Assay“. Dafür wurden pro Ansatz zu 20µl Probe 300µl Reaktionsgemisch (Reagenz A: Reagenz B= 50:1) hinzugegeben, für 30min bei 37°C inkubiert und die Extinktion bei 550nm bestimmt. Der Proteinlysispuffer wurde als Negativkontrolle verwendet. Für die Erstellung der Eichgerade wurde BSA verwendet.

3.4.2 SDS-Page

Für die Auftrennung von Proteinen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) durchgeführt. Die SDS-haltigen Polyacrylamidgele wurden nach der Vorschrift von Laemmli[167] hergestellt. Zur optimalen Auftrennung der Proteine wurden Polyacrylamid-Konzentrationen von 4% im Sammelgel (pH-Wert von 6,8) und 6-10% im Trenngel (pH-Wert von 8,8) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im Elektrophoresepuffer bei einer konstanten Spannung von 60V, einer Stromstärke von 350-400mA für 3h, bei 4°C, wobei die Proben zuvor mit Gelladepuffer versetzt und bei 95°C für 5min denaturiert wurden.

Die Färbung der SDS-Gele erfolgte mit Coomassie Brilliantblau[168] für 1h bei Raumtemperatur, die Entfärbung der Gele erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht.

3.4.3 Western Blot (Tank-Blot-System)

Die aufgetrennten Proteine wurden im Western Blot- Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dafür wurde das „Tank Blot- System“ verwendet. Der Transfer erfolgte bei einer Spannung von 60V, einer Stromstärke von 350-400 mA bei 4°C für 1,5h. Zur Überprüfung der Transfereffizienz wurde die Nitrozellulosemembran im Anschluss mit Ponceau S angefärbt, luftgetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

3.4.4 Antikörper Hybridisierung

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran mit 5% Blocking-Reagenz für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Auf diese Weise werden unspezifische Bindungen des Primärantikörpers minimiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Primärantikörper in TBS-T- Puffer für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Die Konzentration und die eingesetzte Verdünnung sind für jeden Primärantikörper spezifisch (siehe Kapitel 2.5). Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 10min mit TBS-T gewaschen. Nach den Waschgängen erfolgte die Inkubation mit einem spezies-spezifischen, „Meerettich-Peroxidase“ („horseradish peroxidase“-HRP) gekoppelten Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur. Die Konzentration und die angewandten Verdünnungen sind Kapitel 2.5 zu entnehmen. Danach erfolgten erneut drei Waschgänge für jeweils 10min in TBS-T- Puffer. Alle Schritte erfolgten auf einem Schüttler. Nach der Hybridisierung folgte die Detektion des Antikörpers.

3.4.5 Detektion

Für die Detektion des Antigen-Antikörperkomplexes wurde ein Chemilumineszenz-Kit nach Standardprotokoll verwendet. Durch die katalytische Umsetzung der an den Sekundärantikörper gebundenen HRP wurde eine Chemilumineszenz erzeugt. Diese HRP katalysiert die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form, bei der eine Lumineszenz detektiert werden kann. Diese Reaktion konnte durch die Exposition der Membran mit einem Autoradiographiefilm nachgewiesen werden. Der Film wurde nach einer Belichtungszeit von 30s bis 1h entwickelt.

Stripping- Protokoll

Zur erneuten Benutzung der Nitrozellulosemembran muss diese von den bereits gebundenen Antikörpern gereinigt werden. Dafür wurde die Membran für 30min bei 50°C in Stripping-Puffer im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für jeweils 15min in TBS-T-Puffer gewaschen. Für die Proteindarstellung wurde die Membran erneut mit Ponceau S angefärbt.

3.4.6 Western Blot Auswertung

Um die entwickelten Autoradiographiefilme auswerten zu können, wurden diese mit einer Auflösung von 150-300dpi im Graustufen-Modus gescannt. Die Auswertung der Filme erfolgte digital mit der Analyse Software *Alpha Ease 5.5*. Die optische Dichte der Banden wurde bestimmt (IDV). Anhand der standardisierten Eichgerade wurde die Proteinkonzentration berechnet. Somit konnte dem IDV-Wert eine Proteinkonzentration zugewiesen werden. Nach dieser Berechnung wurde ein Quotient aus dem zu untersuchenden Protein und dem Referenzprotein gebildet. Anhand dieses Quotienten kann man eine Aussage über die Proteinexpression in Bezug auf das Referenzprotein treffen. Mit dieser Berechnung erfolgte der Vergleich der relativen Proteinexpression in den zu untersuchenden Tiergruppen.

3.5 Histologie

3.5.1 Paraffineinbettung

Die für die Histologie vorgesehenen Gewebestücke wurden sofort nach der Organentnahme für 12 bis 24 Stunden bei 4°C in 4% Formaldehyd fixiert. Nach Auswaschen des Fixierungsmittels durch PBS-Puffer wurden die Präparate in Einbettkassetten im Paraffinkarussell (Shandon Citadel 1000, Fa. Thermo Electron Corporation) in Paraffin eingebettet. Zunächst durchlaufen die Gewebestücke eine aufsteigende Alkoholreihe für jeweils eine Stunde (70%, 80%, 96% und dreimal 100%). Um die Entfernung von Alkoholresten und damit die Anlagerung des Paraffins zu ermöglichen, wurden die Gewebestücke für eine Stunde in Xylol überführt. Anschließend wurden die Gewebe zunächst für 1,5h in Paraffin 6 und dann 1,5h in Paraffin 9 gebadet.

Für eine adäquate Handhabung wurden die Präparate in Gießschälchen gelegt, mit 56°C warmem Paraffin übergossen und gekühlt. Nach dem Aushärten des Paraffins konnten die Paraffinblöcke aus den Schälchen gelöst werden. Aus den Paraffinblöcken wurden am Schlittenmikrotom (Biocut, Firma Reichert-Jung, Heidelberg) 1-3µm dicke Serienschnitte angefertigt und auf beschichtete Objektträger aufgebracht. Abschließend erfolgte die Trocknung der Schnitte bei 56°C über Nacht im Brutschrank. Die Gewebeschnitte konnten nun nach Protokoll angefärbt werden. Die Paraffinblöckchen wurden bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

3.5.2 Sirius-Rot-Färbung

Als Färbemethode für die Kollagendarstellung wurde die Sirius-Rot -Färbung angewandt. Sie diente der Beurteilung des Gesamtkollagenanteils im Myokardgewebe. Vor der Färbung wurde das Paraffin aus den Schnitten vollständig entfernt. Zunächst wurden die Schnitte für 15min in Xylol gebadet. Anschließend wurden die Schnitte einer absteigenden Alkoholreihe (96%, 80%, 70%, 50%, 30%) und zwei Spülungen mit Aqua_{dest} unterzogen. Anschließend wurde für 90min die Färbung mit Sirius Rot durchgeführt. Um den Überschuss an Farbstoff zu lösen, wurden die Präparate in Aqua_{dest} gewaschen. Nach 15-minütiger Lufttrocknung unter dem Abzug wurden die Schnitte für 10min in Xylol überführt und es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe. Abschließend wurden die trockenen Schnitte mit Eindeckmedium eingeschlossen.

3.5.3 Bestimmung des Gesamtkollagengehalts der histochemischen Präparate

Die Auswertung der mit Sirius Rot angefärbten Herzschnitte zur Quantifizierung der interstitiellen Fibrose erfolgte digital mit dem Programm *Image J* (National Institute of Health, NIH, USA).

Zur morphometrischen Analyse wurden die Gewebsschnitte lichtmikroskopisch ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit mit einem Leica Mikroskop und mit einer Videokamera in 20-facher Vergrößerung im 1024x756-Pixel-RGB-Format und einer Farbqualität von 32 Bit fotografiert (Abbildung 3.15 A). Zunächst wurde aus 40 Einzelbildern der Präparate mit dem Programm *Image J* ein Durchschnittsbild errechnet. Dieses dient der Minimierung von kamerabedingten Artefakten. Für die Analyse der einzelnen Bilder wurde ein selbst programmiertes Makro verwendet. Dieses Makro ermöglicht die Bestimmung des Anteils kollagener Matrix pro Bild. Dabei wird im Grenzwert (Threshold)–Modus eine Schwarz-/Weißgrenze zwischen 0 und 255 Graustufen festgelegt. Die zu messenden Flächen wurden dunkelgrau bis schwarz dargestellt (Abbildung 3.15 B). Durch die Verwendung des Makros wurde es ermöglicht, die Flächen in einem bestimmten Größenbereich unter der Angabe eines minimalen (Abbildung 3.15 C) und maximalen (Abbildung 3.15 D) Grenzwertes zu vermessen. Dabei wurde der Hintergrund, der nicht durch Gewebe abgedeckt war, nicht mit einbezogen. An jedem Präparat wurden zehn zufällig ausgewählte Ausschnitte vermessen. Alle Präparate der zu untersuchenden Gruppen wurden mit den gleichen Einstellungen analysiert.

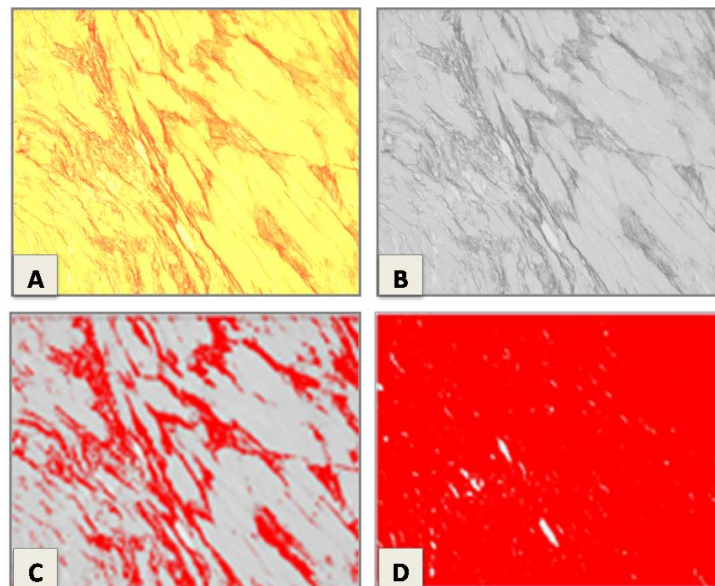


Abbildung 3.15: Abfolge der digitalen Bildanalyse der Sirius Rot-Färbung.

Um den Gesamtkollagengehalt, den so genannten „Fibrosescore“, in Prozent zu ermitteln, wurden die Daten der Bildanalyse mit folgender Formel kalkuliert:

$$\frac{\text{Teilflächenanteil}}{\text{Gesamtfläche}} \times 100 = \text{prozentualer Anteil der kollagenen Strukturen}$$

Diese Berechnung wurde für jedes Bild durchgeführt. Danach wurden die Bilder den zugehörigen Gruppen zugeordnet und ein Mittelwert gebildet.

3.5.4 TUNEL-Assay

Für die Darstellung von apoptotischen Zellen wurde das Flourescein FragEL DNA Fragmentation Detection Kit nach Herstellerangabe verwendet. Für paraffinfixiertes Gewebe wurden die Schnitte zunächst entparaffinisiert und rehydriert. Dafür wurden die Gewebeschnitte 2x 5min in Xylol gebadet und es wurde eine absteigende Alkoholreihe von 100% bis 70% für jeweils 5 und 3min durchgeführt. Nach kurzem Waschen in TBS-Puffer, wurden die Gewebeschnitte permeabilisiert. Dafür wurden die Schnitte mit Proteinase K (20µg/ml) in 10mM Tris-Puffer inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit TBS-Puffer, wurden die Schnitte für 30min bei RT mit 1X TdT Equilibrierungspuffer inkubiert. Nach der Equilibrierung wurden die Gewebeschnitte mit dem TdT-Enzym und dem dazugehörigen TdT – Flourescein gelabelten Reaktionsmix für 90min bei 37°C in einer feuchten Kammer und abgedunkelt inkubiert. Nach mehreren Waschgängen wurden die Schnitte mit DAPI- enthaltenden Eindeckmedium eingeschlossen und mittels Floureszenzmikroskopie analysiert und fotografisch festgehalten.

3.6 Statistik

Statistische Analysen der funktionellen Daten der Echokardiographie, Hämodynamik sowie Gen- und Proteinexpressionen wurden mittels des Statistik-Programm SPSS 15.0 für Windows durchgeführt. Zunächst wurden die Werte auf Normalverteilung geprüft, anhand der ermittelten Schiefe und Kurtosis wurden für einzelne Untersuchungen die Werte einmalig logarhythmisiert. Es wurde eine univariate Varianzanalyse angeschlossen (einfaktorielle ANOVA) und bei beobachteter Wechselwirkung ein Tukey B-Test durchgeführt. Ein p-Wert von <0,05 wurde bei der Auswertung als statistisch signifikant bewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler (MW±SEM).

Für die grafische Darstellung wurden unter anderem „Boxplots“ verwendet. Als Box wird das durch die Quartile bestimmte Rechteck bezeichnet. Sie umfasst 50% der Daten. Durch die Länge der Box ist der Interquartilsabstand ablesbar. Dies ist ein Maß der Streuung, welches durch die Differenz des oberen und unteren Quartils bestimmt ist. Als weiteres Quantil ist der Median in der Box eingezeichnet (horizontale Linie), welcher durch seine Lage innerhalb der Box einen Eindruck von der Schiefe der den Daten zugrunde liegenden Verteilung vermittelt. Das untere Quartil gibt 25% an, während das obere Quartil 75% anzeigt. Die schwarzen Punkte in den hergestellten Graphen zeigen die Ausreißer an. Diese werden als Whisker bezeichnet.

4. Ergebnisse

Die folgende Abbildung zeigt den Verlauf der hier vorgestellten Studie (Abbildung 4.1).

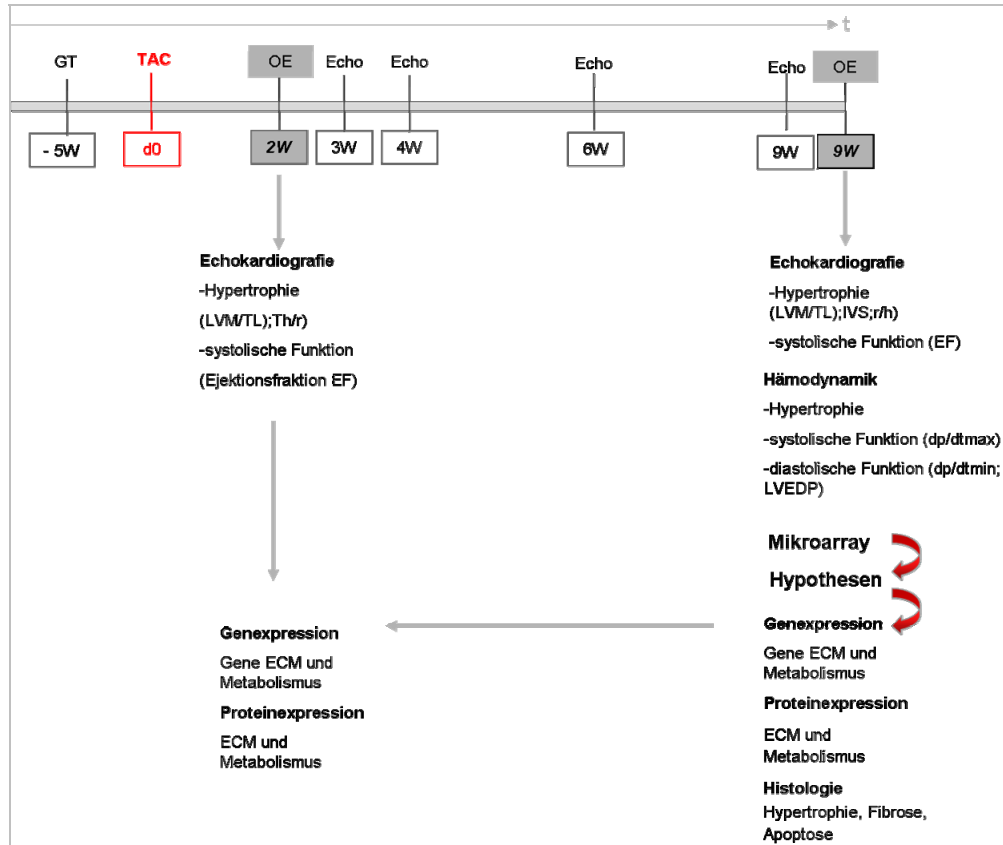


Abbildung 4.1: Studienverlauf.

Zur Beobachtung der Hypertrophieprogression wurden zwei Zeitpunkte (zwei und neun Wochen nach Intervention) gewählt. Auf diese Weise sollten Geschlechterunterschiede in der Herzfunktion, der Gen- sowie Proteinexpression eruiert werden. Der tierexperimentelle Ansatz umfasste 120 Tiere für den Zeitpunkt zwei Wochen und 132 Tiere für den Zeitpunkt neun Wochen nach Intervention.

Die echokardiographische Datenerhebung verfolgte die Analyse der systolischen Herzfunktion über den gesamten Versuchszeitraum. Zum Zeitpunkt von neun Wochen wurden zusätzlich 80 Tiere hämodynamischen Messungen zur Bestimmung der diastolischen Herzfunktion unterzogen. Zu den beiden Endpunkten wurden die Expressionen einiger wichtiger Gene und Proteine des kardialen Metabolismus und des Remodeling untersucht.

Neun Wochen nach Intervention wurden zusätzlich Mikroarray- sowie histologische Analysen durchgeführt. Die exakten Tierzahlen und die durchgeführten Analysen sind detailliert in Kapitel 3.1.5 aufgeführt.

4.1 Geschlechterunterschiede in der Morphologie bei drucklast- induzierter Myokardhypertrophie

4.1.1 Hypertrophieentwicklung

Die erfolgreiche Induktion der TAC führte deutlich zur Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie. Abbildung 4.2 visualisiert die typischen Form- und Größenveränderungen der TAC- Herzen.

Das scheinputeriertere Herz (A) zeigte eine normale Morphologie mit einer apikalen Form. Zwei Wochen nach TAC (B) veränderte sich die Morphologie des Herzens sichtbar: Es verlor seine apikale Form und eine leichte Größenzunahme war zu erkennen. Nach neun Wochen (C) sind Größenzunahme und Formverlust des Herzens wesentlich deutlicher. Die Herzgewichte sind Tabelle 4.1 zu entnehmen.

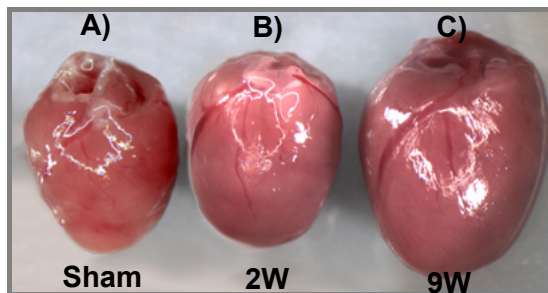


Abbildung 4.2: Hypertrophieentwicklung. Es sind nur männliche WT Herzen exemplarisch dargestellt. A) scheinputeriertes Herz; B) Entwicklung der Hypertrophie nach zwei Wochen. C) Entwicklung der Hypertrophie nach neun Wochen.

Für die Untersuchung einer Hypertrophieentwicklung war die Bestimmung des Herzgewichtes obligat. Die Herzgewichte wurden zwei und neun Wochen nach Intervention bestimmt (Tab. 4.1).

Zwei Wochen nach TAC war in beiden Geschlechtern eine deutliche Zunahme des Herzgewichtes zu beobachten. Insgesamt waren die Herzgewichte der Männchen in allen Untersuchungsgruppen signifikant höher als die der Weibchen. Der Genotyp zeigte keinen Einfluss.

Neun Wochen nach TAC war die Gewichtszunahme der Herzen noch stärker ausgeprägt. Die Herzgewichte der Männchen waren sowohl in den Sham- Tieren, als auch in den TAC- Tieren signifikant höher als die der Weibchen. Dieser Geschlechterunterschied zeigt

sich in allen Gruppen der WT- sowie der scheinoperierten $ER\beta^{-/-}$ - Tiere. $ER\beta^{-/-}$ - Tiere mit TAC ließen keine Geschlechterunterschiede im Herzgewicht erkennen.

Tabelle 4.1: Übersicht der Körpergewichte und Organgewichte nach zwei und neun Wochen. M= Männchen; W= Weibchen; SHAM= Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion, WT= Wildtyp; $ER\beta^{-/-}$ = Östrogen Rezeptor β Knock-out; * $p<0,05$ Männlich vs. Weiblich; # $p<0,05$ TAC vs. SHAM.

Gruppe	Körpergewicht (g)	Herzgewicht (g)	Tibiallänge (mm)	Lungengewicht (g)
2W				
M/SHAM/WT	25,87±1,95*	0,110±0,013*	17,01±0,22	0,21±0,04
W/SHAM/WT	20,90±0,88	0,092±0,008	16,66±0,32	0,18±0,05
M/TAC/WT	24,93±1,59*	0,158±0,029*#	17,06±0,59	0,22±0,07
W/TAC/WT	21,14±1,74	0,131±0,021#	16,74±0,41	0,23±0,07
M/SHAM/$ER\beta^{-/-}$	25,05±1,50*	0,112±0,012*	16,90±0,30	0,20±0,04
W/SHAM/$ER\beta^{-/-}$	20,36±1,59	0,094±0,011	16,78±0,30	0,22±0,06
M/TAC/$ER\beta^{-/-}$	25,30±1,54*	0,139±0,016*#	16,98±0,29	0,20±0,05
W/TAC/$ER\beta^{-/-}$	20,75±1,43	0,127±0,015#	16,69±0,46	0,21±0,04
9W				
M/SHAM/WT	26,9±2,5*	0,12±0,02*	17,3±0,5	0,21±0,03
W/SHAM/WT	23,3±1,2	0,10±0,01	17,2±0,4	0,22±0,04
M/TAC/WT	27,6±2,5*	0,20±0,04*#	17,3±0,5	0,28±0,1#
W/TAC/WT	23,2±2,2	0,17±0,04#	17,1±0,3	0,27±0,09
M/SHAM/$ER\beta^{-/-}$	27,2±2,5*	0,13±0,01*	17,5±0,6	0,21±0,04
W/SHAM/$ER\beta^{-/-}$	22,9±1,4	0,10±0,00	17,1±0,4	0,22±0,09
M/TAC/$ER\beta^{-/-}$	27,6±2,2*	0,18±0,05#	17,3±0,5	0,26±0,05*#
W/TAC/$ER\beta^{-/-}$	23,6±0,9	0,17±0,03#	17,1±0,2	0,21±0,05

4.1.2 Geschlechtsspezifische Zunahme der morphologischen Hypertrophiemarker

Zur Bestimmung der Hypertrophieentwicklung wurde das Herzgewicht auf die Tibiallänge normalisiert (HG/TL- Quotient). Dieser Quotient wurde als morphologischer Hypertrophiemarker dargestellt (Abbildung 4.3).

Ein weiterer Parameter zur Normalisierung der Herzgewichte ist das Körpergewicht. Dies kann jedoch sowohl geschlechtsbedingt als auch durch mögliche Komplikationen beim Eingriff, wie beispielsweise Ödembildungen, erheblichen Schwankungen unterliegen. Die Tibiallänge hingegen ist ein relativ konstanter Parameter. Sie fungiert als Index für das Wachstum und ist unabhängig von Körpergewicht, Fettanteil, Muskelmasse und Flüssigkeitshaushalt (siehe hierzu Tabelle 4.1)

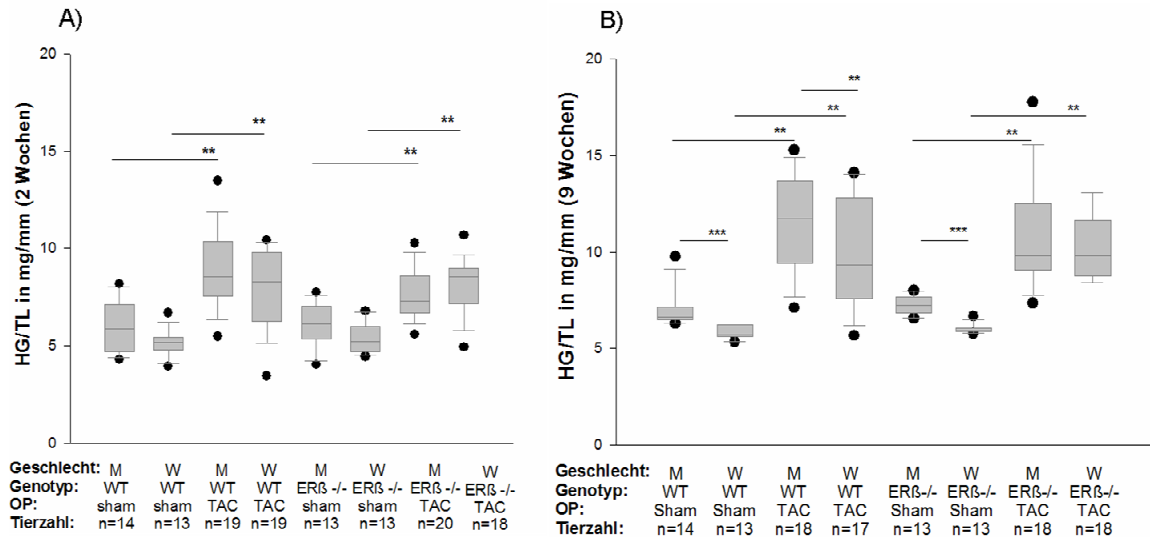


Abbildung 4.3: A) Darstellung des HG/TL Quotienten in mg/mm nach zwei Wochen; B) Darstellung des HG/TL Quotienten in mg/mm nach neun Wochen. Die Darstellung erfolgte in „Boxplots“ siehe auch Kapitel 3.6 M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ERβ^{-/-} = Östrogen Rezeptor β Knock-out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P-Wert mit 0,05 an; ** gibt den P-Wert mit 0,01 an.

WT- und ERβ^{-/-} - Tiere zeigten sowohl zwei als auch neun Wochen nach TAC in beiden Geschlechtergruppen einen signifikanten Anstieg der HG/TL- Ratio im Vergleich zu den scheinputierten Tieren (Abbildung 4.3 A/B).

Zwei Wochen nach Intervention waren weder Geschlechterunterschiede noch Einflüsse des Genotyps zu beobachten.

Neun Wochen nach TAC war die Zunahme der HG/TL- Ratio in WT- Männchen signifikant stärker ausgeprägt als in WT- Weibchen (11,84mg/mm_{M/WT/TAC} vs. 9,80mg/mm_{W/WT/TAC}). Die Hypertrophieentwicklung ist demnach in beiden Geschlechtern unterschiedlich verlaufen. Ein Geschlechterunterschied nach TAC konnte in den ERβ^{-/-} - Tieren nicht festgestellt werden.

Die Herzgewichte wurden einerseits über das Auswiegen, andererseits über die Kalkulation der linksventrikulären Masse (LVM) durch Echokardiographie bestimmt. In der nachfolgenden Datenanalyse wurde die LV- Masse (LVM) durch die Messung von Wanddicke und Durchmesser des linken Ventrikels berechnet. Über die Zunahme der LVM konnte auf den Grad der Hypertrophie geschlossen werden. Die LVM wurde über das Verhältnis zur Tibialänge normalisiert (Abbildung 4.4).

Zwei Wochen postoperativ (A) konnte sowohl in den WT- als auch in den ERβ^{-/-} - Tieren eine signifikante Zunahme der LVM/TL- Ratio nach Induktion einer TAC im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe beobachtet werden. Geschlechterunterschiede im Anstieg der LVM sowie genotypabhängige Veränderungen waren nicht zu verzeichnen.

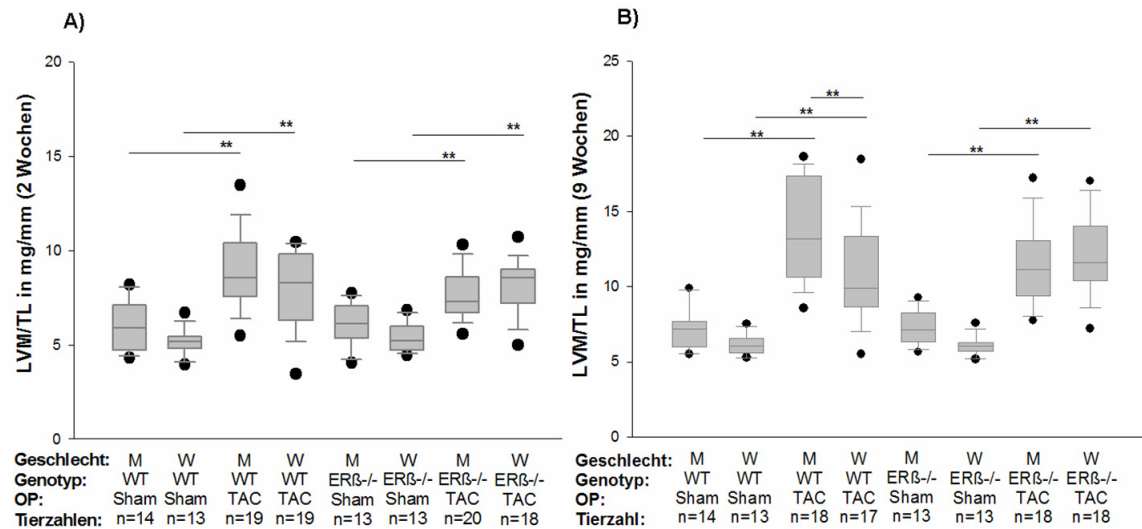


Abbildung 4.4: A) Darstellung der LVM/TL Ratio in mg/mm zwei Wochen postoperativ. B) Darstellung der LVM/TL Ratio in mg/mm nach neun Wochen. Darstellung in „Boxplots“ siehe auch Kapitel 3.6; M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ERβ^{-/-} = Östrogen Rezeptor β Knock-out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P-Wert mit 0,05 an; ** gibt den P-Wert mit 0,01 an.

Neun Wochen nach Intervention (B) erhöhte sich die LVM/TL- Ratio in den WT- Tieren nach TAC signifikant in beiden Geschlechtern im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die männlichen TAC- Tiere entwickelten jedoch ein höheres Maß an Hypertrophie als die weiblichen Tiere nach TAC (13,78mg/mm_{M/WT/TAC} vs. 10,85mg/mm_{W/WT/TAC}).

ERβ^{-/-}- Tiere mit TAC zeigten zu diesem Zeitpunkt in beiden Geschlechtern eine signifikant höhere LVM/TL- Ratio im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Festzustellen ist hier, dass weibliche ERβ^{-/-}- Tiere mit TAC im Vergleich zu weiblichen WT- Tieren eine stärkere Hypertrophie entwickelten, wenn auch die Schwelle zur statistischen Signifikanz von p<0,05 nicht erreicht wurde. Männliche ERβ^{-/-}- Tiere mit TAC hingegen wiesen einen Trend zu geringerer Hypertrophieentwicklung als WT- Tiere mit TAC auf (12,05mg/mm_{W/ERβ^{-/-}/TAC} vs. 10,85mg/mm_{W/WT/TAC} und 11,42mg/mm_{M/ERβ^{-/-}/TAC} vs. 13,78mg/mm_{M/WT/TAC}).

Herzgewicht und echokardiographisch kalkulierte LVM zeigten, bezogen auf die Tibia-Länge, übereinstimmende Resultate: Ein Geschlechterunterschied in der Ausprägung der Myokardhypertrophie wurde sowohl im Parameter HG/TL als auch im Parameter LVM/TL zum späten Zeitpunkt von neun Wochen festgestellt. Mit dem letzteren *in vivo* gewonnenen Parameter konnte ausschließlich die linksventrikuläre Masse bzw. Hypertrophie betrachtet werden. Daraus ist ersichtlich, dass Gewicht und Ausmaße des rechten Ventrikels vernachlässigt werden konnten. LVM/TL ist der präzisere Parameter zur Beurteilung des Hypertrophiegrades.

4.2 Geschlechterunterschiede in der Funktion bei drucklast- induzierter Myokardhypertrophie

4.2.1 Echokardiografische Analyse der systolischen Funktion bei Myokardhypertrophie

Mit dem Ultraschallgerät war es möglich, Parameter, wie die Ejektionsfraktion (EF), zu bestimmen. Die Ejektionsfraktion ist die prozentuale Auswurfsfraktion vom maximalen, also dem enddiastolischen Volumen des linken Ventrikels und bezeichnet einen klinisch relevanten Parameter der systolischen Funktion. Die Ejektionsfraktion ist von der Vor- und Nachlast und somit vom Volumen abhängig (Abbildung 4.5).

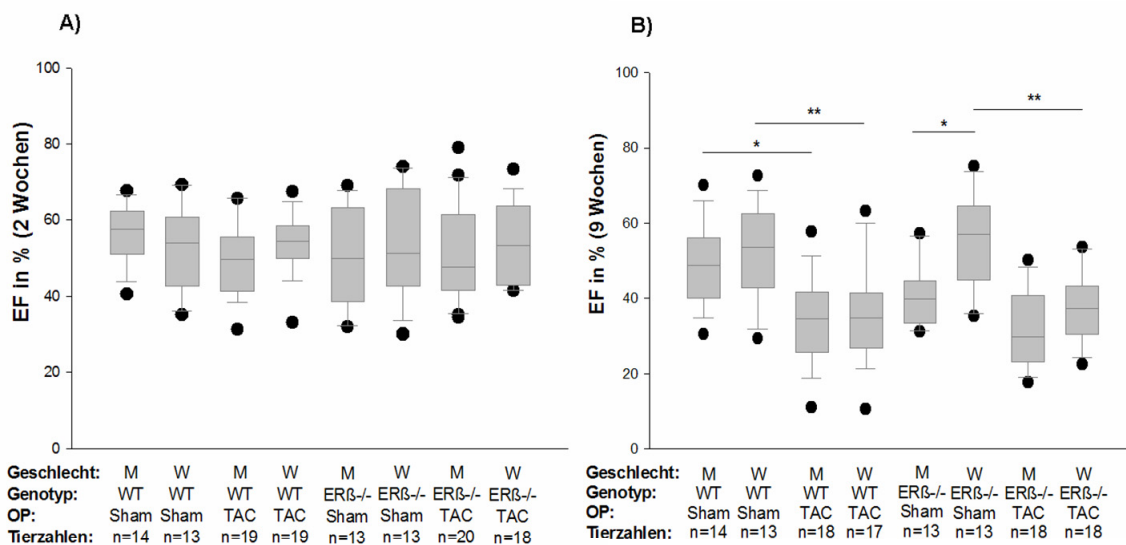


Abbildung 4.5: A) Darstellung der EF in % zwei Wochen postoperativ; B) Darstellung der EF in % neun Wochen postoperativ. Darstellung in „Boxplots“ siehe auch Kapitel 3.6; M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ERβ^{-/-} = Östrogen Rezeptor β Knock-out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P-Wert mit 0,05 an; ** gibt den P-Wert mit 0,01 an.

Nach zwei Wochen (A) konnten in der EF in keiner der untersuchten Gruppen signifikante Veränderungen beobachtet werden. Die EF schwankte zwischen 48- 52%. Nach neun Wochen (B) zeigten die WT- Tiere nach TAC- Operation im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe einen signifikanten Funktionsverlust in beiden Geschlechtern. Die EF betrug in den männlichen scheineroperierten Tieren 49%; in den männlichen Tieren nach TAC- Induktion war eine EF von 34 % zu beobachten. Die EF der weiblichen scheineroperierten Tiere betrug 54%; nach TAC Induktion war ein Absinken der Funktion zu beobachten, die sich in einer EF von 36% darstellte. Geschlechterunterschiede waren nicht zu verzeichnen.

In den ERβ^{-/-} Tieren zeigte sich zu diesem Zeitpunkt ebenfalls ein starker Abfall der EF nach TAC im Vergleich zur dazugehörigen Kontrollgruppe. Männliche scheineroperierte Tiere verloren ihre Herzfunktion in erheblichem Maße, was sich an einem Absinken der

EF auf durchschnittlich 40% manifestierte. Nach TAC- Induktion konnte eine weitere Abnahme der EF bis auf 32% beobachtet werden. Diese Abnahme erreichte jedoch kein Signifikanzniveau. In den weiblichen Tieren sank die EF signifikant von 55% in den scheinoperierten Tieren auf 38% in den Tieren mit TAC.

Geschlechterunterschiede sind demnach zwar in den SHAM- Tieren nachweisbar, nicht jedoch in den TAC- Tieren mit ER β - Deletion. Die EF war in diesen Männchen basal niedriger (EF=40%) als in der weiblichen Kontrollgruppe (EF=57%).

4.2.2 Zeitlicher Verlauf der EF: Verlust der systolischen Funktion nach vier Wochen

Das engmaschige Monitoring der EF nach zwei, drei, vier, sechs und neun Wochen postoperativ erlaubte eine Verlaufskontrolle. Die Verlaufskurven wurden nach dem Genotyp WT (Abbildung 4.6) und ER β ^{-/-} (Abbildung 4.7) unterteilt.

Die WT- Gruppen zeigten zwei Wochen nach Intervention keine signifikanten Veränderungen in der EF (48- 52%). Die EF der scheinoperierten Tiere blieb bis zur letzten echokardiographischen Untersuchung nach neun Wochen relativ konstant. In den TAC-Tieren konnte in den männlichen und weiblichen Tieren ab der vierten Woche bis hin zur neunten Woche ein signifikanter Abfall der EF beobachtet werden ($p \leq 0,01$). Der Abfall der EF war in den männlichen Tieren tendenziell stärker ausgeprägt, signifikante Geschlechterunterschiede wurden jedoch nicht ausgewiesen (EF_{M/WT/TAC}=34%; EF_{W/WT/TAC}=36%).

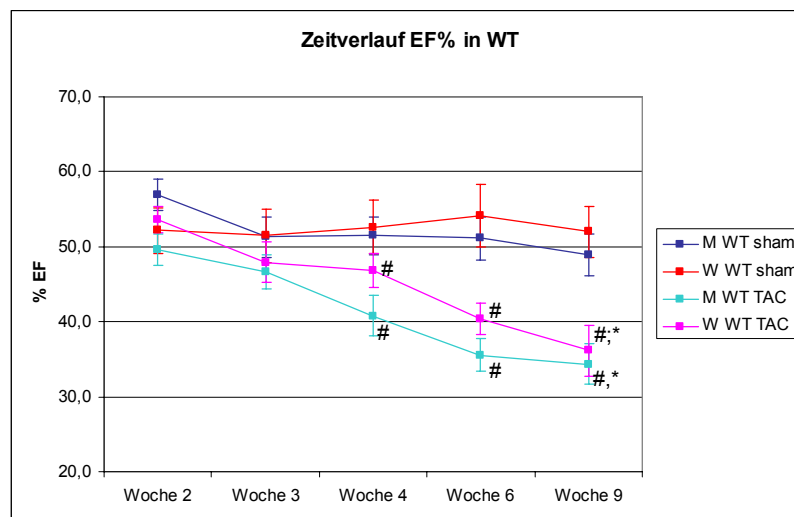


Abbildung 4.6: Zeitlicher Verlauf der Auswurfraction (EF) in % in WT- Tieren. Es ist die EF nach zwei, drei, vier, sechs und neun Wochen postoperativ dargestellt. M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion # gibt den p-Wert< 0,05 TAC vs. Sham; * gibt den p-Wert<0,05 neun vs. zwei Wochen an.

Zwei Wochen nach Intervention ergaben die Untersuchungen zur EF in den $ER\beta^{-/-}$ Tieren (Abbildung 4.7) keine signifikanten Veränderungen (48- 52%). Die EF der weiblichen scheinoperierten Tiere blieb bis zur letzten echokardiographischen Untersuchung von neun Wochen relativ konstant. In den männlichen und weiblichen TAC- Tieren konnte ab der vierten Woche bis zur neunten Woche ein signifikanter Abfall der EF beobachtet werden ($EF_{M/ER\beta^{-/-}/TAC}=32\%$; $EF_{W/ER\beta^{-/-}/TAC}=38\%$); in männlichen Tieren tendenziell stärker als in weiblichen Tieren. Eine weitere Beobachtung konnte man ebenfalls in den männlichen scheinoperierten Tieren feststellen. Die EF in diesen Tieren war signifikant niedriger als die EF der weiblichen Vergleichsgruppe. ($EF_{M/ER\beta^{-/-}/sham}=40\%$). Damit konnte ein Geschlechterunterschied in der systolischen Funktion in den scheinoperierten Tiere festgestellt werden ($EF_{M/ER\beta^{-/-}/sham}=40\%$; $EF_{W/ER\beta^{-/-}/sham}=55\%$).

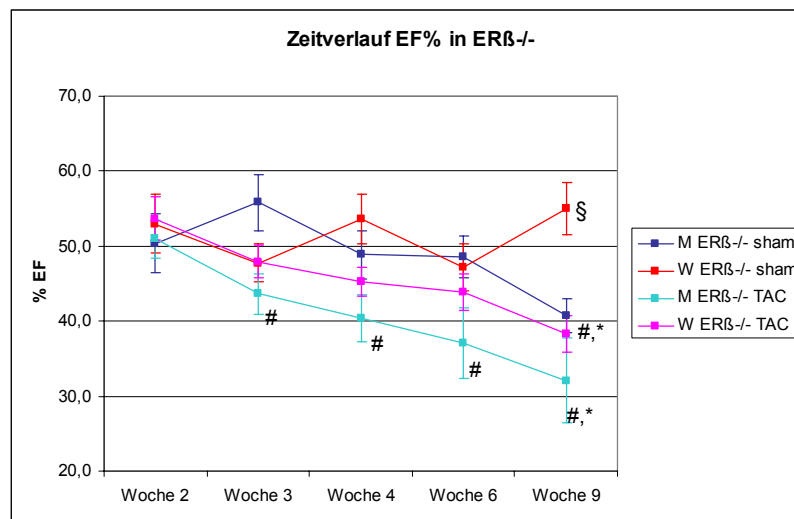


Abbildung 4.7: Zeitlicher Verlauf der Auswurfraction (EF) in % in $ER\beta^{-/-}$ Tieren. Es ist die EF nach zwei, drei, vier, sechs und neun Wochen postoperativ dargestellt. M = Männchen; W = Weibchen; $ER\beta^{-/-}$ = Östrogen Rezeptor β Knock-out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; # gibt den p-Wert < 0,05 TAC vs. Sham; * gibt den p-Wert < 0,05 neun vs. zwei Wochen an; § gibt den p-Wert < 0,05 Männchen vs. Weibchen.

4.2.3 Die konzentrische Hypertrophie ist die dominierende Hypertrophieform-Übergang zur Dilatation?

Die relative linksventrikuläre Wanddicke stellt einen Parameter zur Bestimmung der vorliegenden Hypertrophieform (konzentrisch oder exzentrisch) zur Verfügung (Abbildung 4.8). Ein Th/R Quotient von 0,33 gilt als physiologisch. Höhere Werte werden bei Patienten mit konzentrischer Hypertrophie gefunden. Sinken diese Werte, so ist dies ein Hinweis auf eine exzentrische Hypertrophie.

Die Induktion einer TAC führte nach zwei und neun Wochen sowohl in den männlichen als auch in den weiblichen WT- und $ER\beta^{-/-}$ - Tieren zu einem signifikanten Anstieg der relativen Wanddicke im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Zwei Wochen nach TAC konnte noch kein Geschlechterunterschied verzeichnet werden.

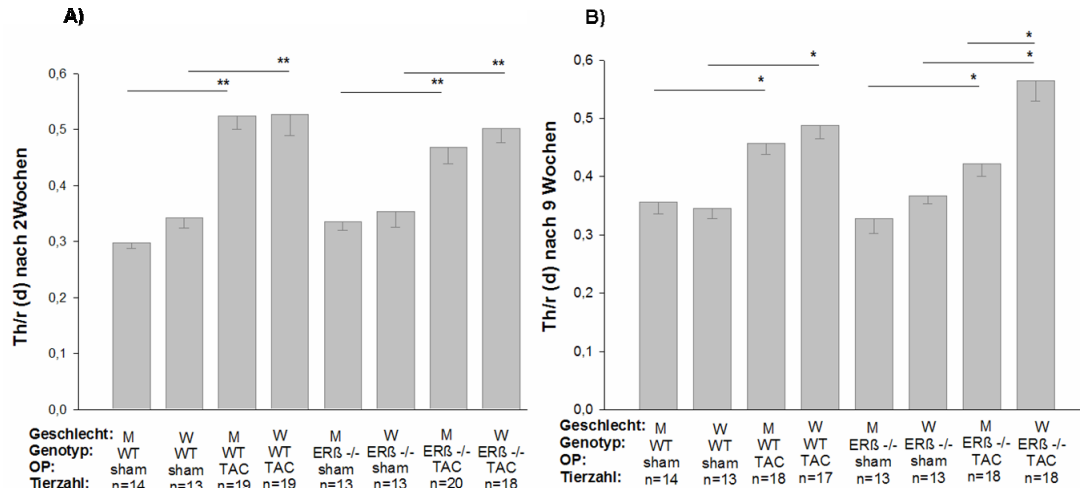


Abbildung 4.8: A) Darstellung der relativen Wanddicke (Th/r) nach zwei Wochen; B) Darstellung der relativen Wanddicke (Th/r) nach neun Wochen. M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; $ER\beta^{-/-}$ = Östrogen Rezeptor β Knock-out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P-Wert mit 0,05 an; ** gibt den P-Wert mit 0,01.

Der Th/r- Quotient der männlichen WT- Tiere fiel von der zweiten zur neunten Woche nach TAC signifikant ab ($p \leq 0,05$). Die weiblichen Tiere gleicher Intervention und gleichen Genotyps wiesen keinen entsprechenden Effekt aus.

In der neunten Versuchswoche nach TAC- Induktion war die relative Wanddicke der weiblichen $ER\beta^{-/-}$ - Tiere signifikant höher als die der männlichen $ER\beta^{-/-}$ - Tiere. Die relative Wanddicke der männlichen $ER\beta^{-/-}$ - Mäuse fiel von der zweiten zur neunten Woche signifikant ab ($p \leq 0,05$). Damit ist eine Abnahme der relativen Wanddicke zu beobachten, was ein Hinweis auf eine Dilatation ist. Weibliche $ER\beta^{-/-}$ - Mäuse mit einer TAC zeigten die höchste relative Wanddicke aller Versuchsgruppen (Abbildung 4.8 B). Der Th/r- Quotient zeigte keine Veränderungen in den Sham- Gruppen (Abbildung 4.8 A/B)

4.2.4 Hämodynamische Charakterisierung: Beurteilung der Herzfunktion bei Myokardhypertrophie

Die hämodynamische Charakterisierung ermöglichte die Beschreibung der systolischen und diastolischen Funktion des Herzens während der Entwicklung einer pathologischen Myokardhypertrophie. Durch die Bestimmung des linksventrikulären Druckes (LVP_{max} in mmHg) war es möglich, Druckveränderungen in der Systole als Folge der erhöhten Drucklast zu determinieren (Abbildung 4.9 A).

Nach Induktion einer Aortenstenose neun Wochen postoperativ erhöhte sich LVP_{max} in den WT- Tieren und den $ER\beta^{-/-}$ - Tieren in beiden Geschlechtern signifikant. Die enorme Zunahme des mittleren linksventrikulären Druckes verlief ohne Geschlechterunterschiede und unabhängig vom Genotyp. Tendenziell wiesen die $ER\beta^{-/-}$ - Kontrolltiere basal etwas höhere Drücke auf als die WT- Kontrolltiere (Abbildung 4.9):

(94mmHg_{M/WT/Sham} vs. 160mmHg_{M/WT/TAC}/92mmHg_{W/WT/Sham} vs. 164mmHg_{W/WT/TAC})
 (117mmHg_{M/ $ER\beta^{-/-}$ /Sham} vs. 154mmHg_{M/ $ER\beta^{-/-}$ /TAC}/104mmHg_{W/ $ER\beta^{-/-}$ /Sham} vs. 154mmHg_{W/ $ER\beta^{-/-}$ /TAC}).

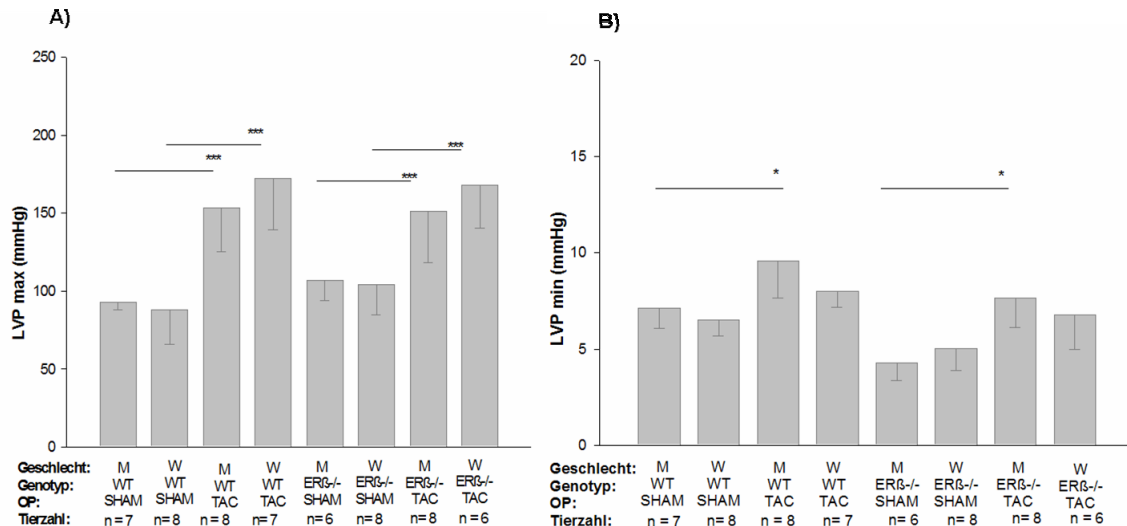


Abbildung 4.9: A) Darstellung des linksventrikulären systolischen Druckes (LVPmax); B) Darstellung des linksventrikulären frühdiastolischen Druckes (LVPmin) nach neun Wochen. M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; $ER\beta^{-/-}$ = Östrogen Rezeptor β Knock-out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P-Wert mit 0,05 an; ** gibt den P-Wert mit 0,01 an.

LVP_{min} wird zur Bestimmung frühdiastolischer Veränderungen oder einer Dysfunktion in der frühen Relaxationsphase des Myokards herangezogen (Abbildung 4.9 B). Neun Wochen nach Induktion der Druckbelastung erhöhte sich LVP_{min} signifikant nur in den männlichen WT- und $ER\beta^{-/-}$ - Tieren. In den männlichen WT- Tieren stieg der mittlere linksventrikuläre Druck von 7mmHg_{M/WT/Sham} auf 10mmHg_{M/WT/TAC}. In den männlichen $ER\beta^{-/-}$ - Tieren von 4mmHg_{M/ $ER\beta^{-/-}$ /Sham} auf 8mmHg_{M/ $ER\beta^{-/-}$ /TAC}. In den weiblichen Tieren beider Genotypen stieg der LVP_{min} nur leicht an, ein Signifikanzniveau wurde nicht erreicht. Es konnte zudem kein signifikanter Geschlechterunterschied festgestellt werden.

Der Parameter dP/dt_{max} ist ein Maß für die systolische Herzfunktion und stellt die Druckanstiegsgeschwindigkeit im linken Ventrikel dar. Dieser gibt Auskunft über die Kontraktilität des linken Ventrikels (Abbildung 4.10 A).

Bei Drucklast stieg dP/dt_{max} in den WT- und $ER\beta^{-/-}$ - Tieren im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe signifikant an (Abbildung 4.10 A/B). Die Zunahme der Kontraktion konnte in beiden Geschlechtern beobachtet werden und blieb unbeeinflusst vom Genotyp.

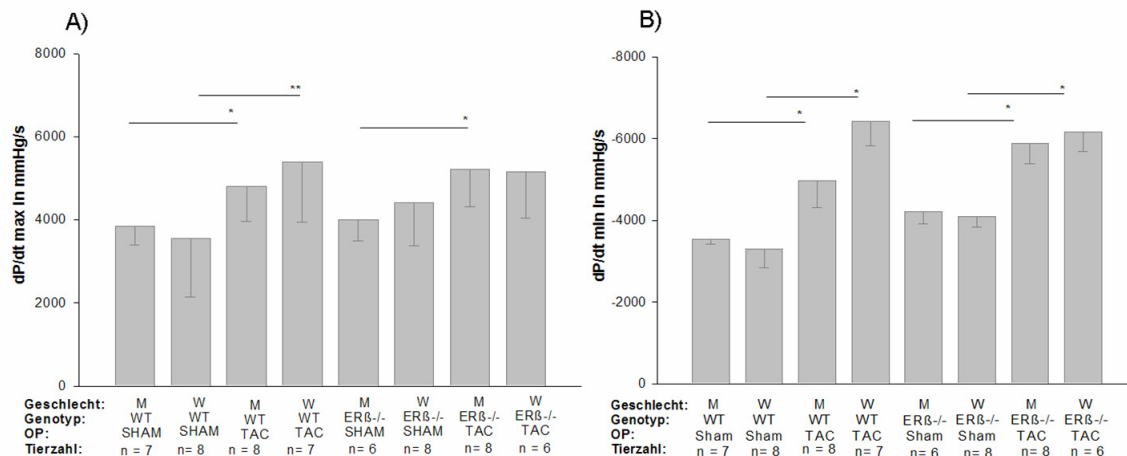


Abbildung 4.10: A) Darstellung der Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}; B) Darstellung der Druckabfallgeschwindigkeit (dP/dt_{min}) nach neun Wochen. M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ERβ^{-/-} = Östrogen Rezeptor β Knock-out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P-Wert mit 0,05 an; ** gibt den P-Wert mit 0,01 an.

Die Druckabfallgeschwindigkeit dP/dt_{min} ist ein Parameter der Diastole. Die Messung zeigt, ob durch die TAC- Induktion eine Funktionsstörung in der frühdiastolischen Relaxation vorliegt (Abbildung 4.10 B).

In den WT- und den ERβ^{-/-}- Tieren mit TAC war dP/dt_{min} im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe signifikant angestiegen (Abbildung 4.10 B). Diese frühdiastolische Störung wurde in beiden Geschlechtern und Genotypen beobachtet.

Die diastolische Herzfunktion wurde durch die Messung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP) beurteilt (Abbildung 4.11 A). Dieser stellt einen der wichtigsten Parameter der diastolischen Funktion dar. Hierbei handelt es sich um den Druck, der am Ende der Diastole (kurz vor Beginn der systolischen Kontraktion) im linken Ventrikel gemessen wird.

Neun Wochen nach TAC- Induktion konnte in den männlichen WT- Tieren eine signifikante Zunahme des LVEDP im Vergleich zu den SHAM- Tieren verzeichnet werden. Diese Zunahme (11mmHg_{M/WT/Sham} vs. 16,5 mmHg_{M/WT/TAC}) war nur in den männlichen Tieren statistisch signifikant. Geschlechterunterschiede konnten nicht dokumentiert werden.

In den ERβ^{-/-}- Tieren zeigte sich eine hochsignifikante Erhöhung des LVEDP in beiden Geschlechtern nach TAC- Induktion. In den männlichen Tieren stieg der LVEDP von 8mmHg_{M/ERβ^{-/-}/Sham} auf 17mmHg_{M/ERβ^{-/-}/TAC} an. In den weiblichen Tieren stieg der enddiastolische Druck von 7mmHg_{W/ERβ^{-/-}/Sham} auf 13mmHg_{W/ERβ^{-/-}/TAC} an. Diese Zunahme war sowohl vom Geschlecht als auch vom Genotyp unabhängig.

Die Herzfrequenz blieb trotz des invasiven Eingriffs mit Narkotisierung stabil. Negative Narkoseeffekte, wie beispielsweise ein starker Abfall der Herzfrequenz, wurden nicht beobachtet. Die mittlere Herzfrequenz betrug in allen untersuchten Gruppen durchschnittlich 450 Schläge pro min (Abbildung 4.11 B).

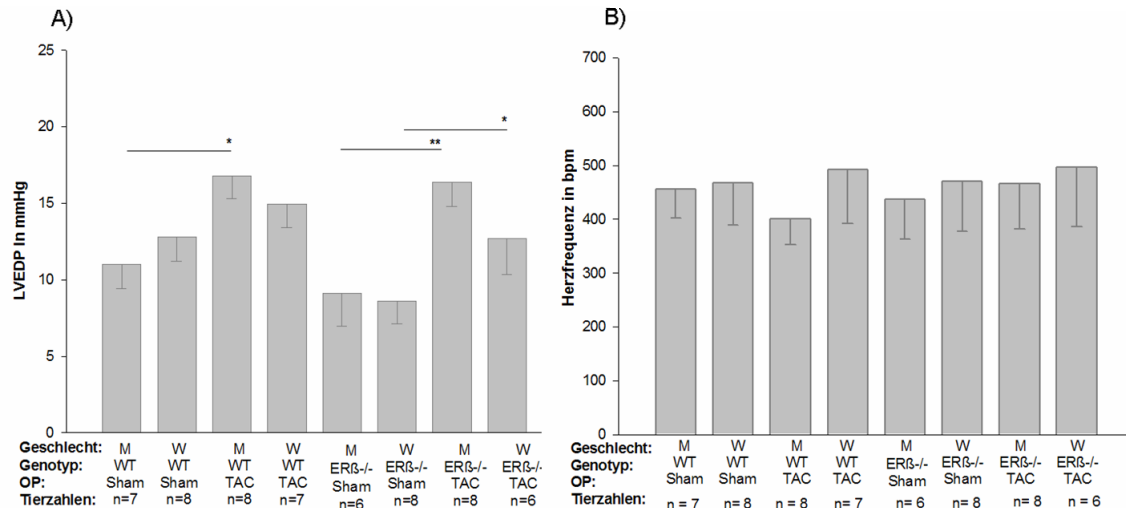


Abbildung 4.11: A) Darstellung des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP); B) Darstellung der Herzfrequenz nach neun Wochen (bpm). M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ERβ^{-/-} = Östrogen Rezeptor β Knock-out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P-Wert mit 0,05 an; ** gibt den P-Wert mit 0,01 an.

Nach der echokardiographischen und hämodynamischen Charakterisierung wurden die Tiere getötet und die Organe entnommen.

Die Lungen wurden sowohl im feuchten als auch im trockenen Zustand gewogen, um etwaige Ödembildungen als Folge der induzierten Drucklast zu bestimmen (Tabelle 4.1). Nach zwei Wochen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Lungengewichten. Nach neun Wochen konnte eine signifikante Zunahme des Lungengewichtes in den WT- Männchen nach TAC beobachtet werden (von 0,21g auf 0,28g). Das Lungengewicht der ERβ^{-/-} Männchen nahm nach TAC zu, erreichte jedoch keine Signifikanz (0,21g auf 0,26g). Es konnten keine signifikanten Geschlechterunterschiede beobachtet werden.

Zusammenfassung zur Charakterisierung der kardialen Funktion

In der frühen Phase der Myokardhypertrophie kompensierte das Herz die induzierte Drucklast, die Auswurfraction (EF) zeigte keine Veränderungen. Die systolische Funktion des Herzens war nicht beeinträchtigt. Bei anhaltender Drucklast zeigte sich nach vier Wochen ein beginnender Verlust der Kontraktilität in beiden Geschlechtern und Genotypen. Dieser Verlust verstärkte sich bis zum Neun- Wochen- Zeitpunkt und war

tendenziell stärker in den männlichen Individuen ausgeprägt. Die stärkste Reduktion zeigten $ER\beta^{-/-}$ - Männchen.

Der Dilatationsindex (Th/r) wies für die frühe Phase in allen Gruppen eine konzentrische Hypertrophie aus. Die andauernde Drucklast führte in den männlichen $ER\beta^{-/-}$ - Tieren zur Abnahme des Quotienten. Dies ist ein Indiz für eine beginnende Dilatation. Die hämodynamischen Messungen ergaben eine systolische und diastolische Dysfunktion in den untersuchten Gruppen, unbeeinflusst von Geschlecht und Genotyp.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die Tiere molekularbiologisch und biochemisch charakterisiert. Für die molekulare Bestimmung einer pathologischen Myokardhypertrophie stehen eine Reihe herzspezifischer Molekularmarker zur Verfügung. Diese ermöglichen einen Einblick in die Entwicklung einer Myokardhypertrophie oder Herzinsuffizienz.

4.2.5 Molekulare Hypertrophiemarker

Eine erhöhte Drucklast und andere kardiale Stressfaktoren führen zur Induktion eines fetalen hypertrophie- assoziierten Genprogramms. Für die molekulare Bestimmung der Myokardhypertrophie wurden folgende typische Markergene gewählt: Atriales Natriuretisches Peptid (ANP), Brain Natriuretisches Peptid (BNP), α - Myosin heavy chain (Myh6), β - Myosin heavy chain (Myh7). Die Genexpressionen wurden auf das Referenzgen HPRT normalisiert. Es wurde die relative Genexpression dargestellt. Die Expressionen der Gene für **ANP** und **BNP** werden als Marker für die Induktion des embryonalen Genprogramms bei linksventrikulärer Hypertrophie betrachtet [169,170,171]. Sowohl zwei als auch neun Wochen nach TAC- Induktion erhöhte sich die Expression von ANP (Abbildung 4.12 A/B) und BNP (Abbildung 4.12 C/D) signifikant in beiden Geschlechtern und Genotypen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Geschlechterunterschiede oder genotypabhängige Veränderungen wurden nicht beobachtet. Im Expressionsmuster von BNP traten zwischen dem Zwei- und Neun-Wochen- Zeitpunkt nur interindividuelle Schwankungen, jedoch keine signifikanten Unterschiede auf. Ein wesentlicher Unterschied bestand in der verstärkten Expressionsrate von ANP nach neun Wochen.

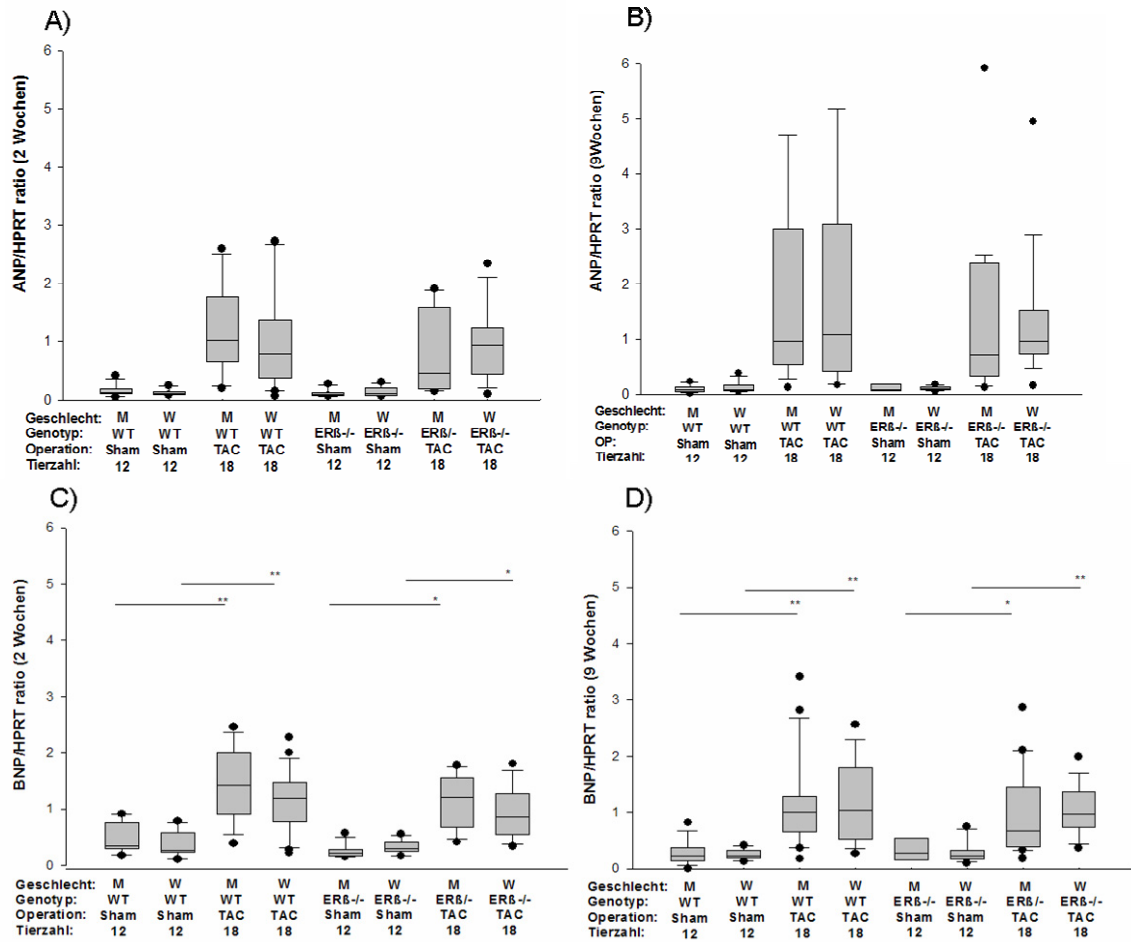


Abbildung 4.12: A) Genexpression von ANP nach zwei Wochen; B) Genexpression von ANP nach neun Wochen, C) Genexpression von BNP nach zwei Wochen; D) Genexpression von BNP im myokardialen Gewebe nach neun Wochen. Die Darstellung erfolgte in „Boxplots“ siehe auch Kapitel 3.6. M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ERβ^{-/-} = Östrogen Rezeptor β Knock- out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P- Wert mit 0,05 an; ** gibt den P- Wert mit 0,01 an.

Weiterhin wurden die Genexpressionen von **Myh7** und **Myh6** untersucht (Abbildung 4.13 A- D). Bei Herzversagen konnte sowohl in Mäusen als auch in Menschen eine Verschiebung der „Myosin heavy Chain“- Isoformen beobachtet werden [172,173]. Dabei wurde die Verschiebung von der adulten Form (Myh6) zur fetalen Form (Myh7) festgestellt.

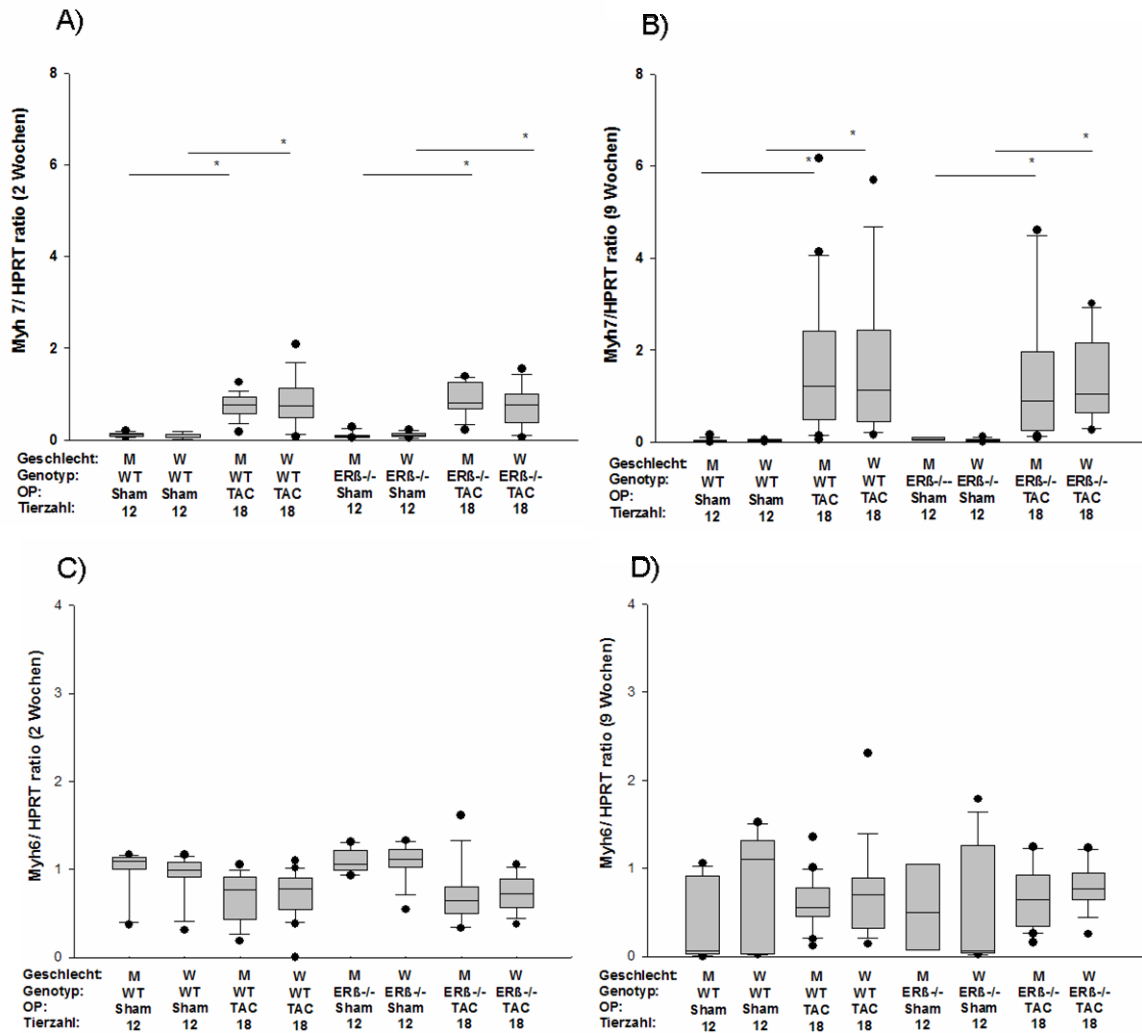


Abbildung 4.13: A) Genexpression von Myh7 nach zwei Wochen; B) Genexpression von Myh7 nach neun Wochen; C) Genexpression von Myh6 nach zwei Wochen; D) Genexpression von Myh6 nach neun Wochen. Die Darstellung erfolgte in „Boxplots“ siehe auch Kapitel 3.6. M= Männchen; W= Weibchen; WT = Wildtyp; ERβ^{-/-} = Östrogen Rezeptor β Knock- out; SHAM= Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P- Wert mit 0,05 an;

Das Expressionsmuster von **Myh7** verhielt sich analog zur Genexpression von ANP. Die Expression von *Myh7* nahm unabhängig vom Genotyp zu beiden Zeitpunkten signifikant nach Induktion einer TAC zu (Abbildung 4.13 A/B). Geschlechterunterschiede waren nicht feststellbar. Zum Neun- Wochen- Zeitpunkt war die relative Expression von *Myh7* im Vergleich zum Zwei- Wochen- Zeitpunkt deutlich erhöht und wies eine höhere Streuung auf.

Die Expression von **Myh6** blieb zwei und neun Wochen nach Intervention in allen untersuchten Gruppen relativ konstant (Abbildung 4.13 C/D). Nach neun Wochen zeigte die Expression von *Myh6* eine größere Streuung im Vergleich zum Zwei- Wochen- Zeitpunkt. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren nach TAC- oder SHAM- Operation festgestellt werden.

4.2.6 Korrelation morphologischer und molekularer Hypertrophiemarker

Morphologische und molekulare Hypertrophiemarker zeigen eine starke Korrelation. Abbildung 4.15 A und B stellen exemplarisch die Korrelation von ANP und BNP zu LVM/TL dar. Die Korrelation (nach Pearson- zweiseitig) zwischen ANP, BNP und LVM/TL zeigte ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,01$ an. Das R^2 (Bestimmtheitsmaß) beträgt für beide Korrelationen annähernd 0,5, das bedeutet: etwa 50% der Streuung von LVM/TL können durch eine lineare Abhängigkeit von ANP und BNP erklärt werden.

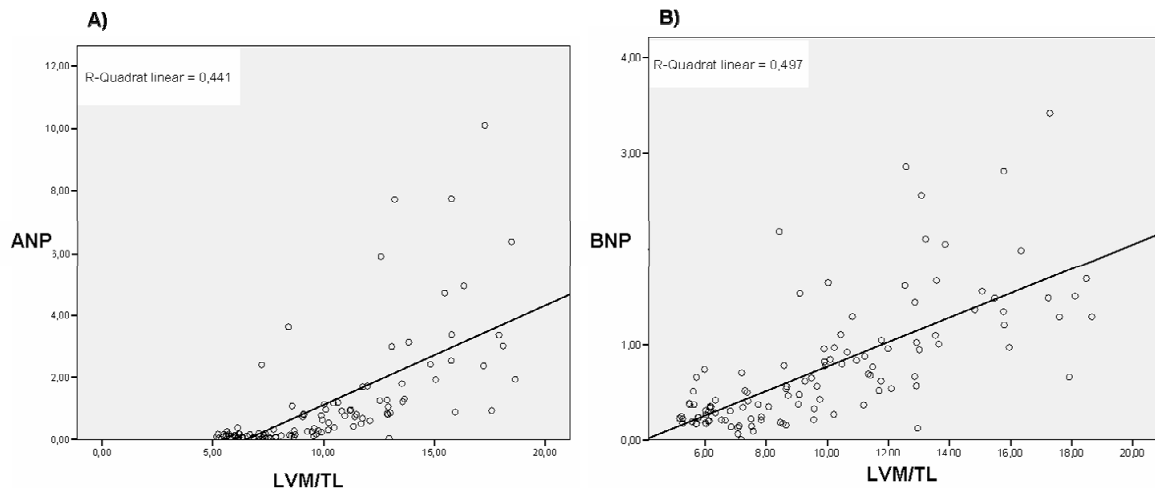


Abbildung 4.14: A) Korrelation von ANP zu LVM/TL nach neun Wochen; B) Korrelation von BNP zu LVM/TL nach neun Wochen.

4.2.7 ER α - Genexpression unbeeinflusst von ER β - Deletion

Zu Beginn der Studie sollte der Einfluss der ER β - Deletion auf die Genexpression des Östrogenrezeptors α (ER α) untersucht werden. Damit sollte überprüft werden, ob mögliche geschlechtsspezifische Aspekte bei induzierter Drucklast eventuell über ER α vermittelt werden können.

Die Genexpression des ER α zeigte keine Veränderung nach neun Wochen (Abbildung 4.15). Die Expression blieb unbeeinflusst von der Intervention, dem Geschlecht und sogar vom Genotyp.

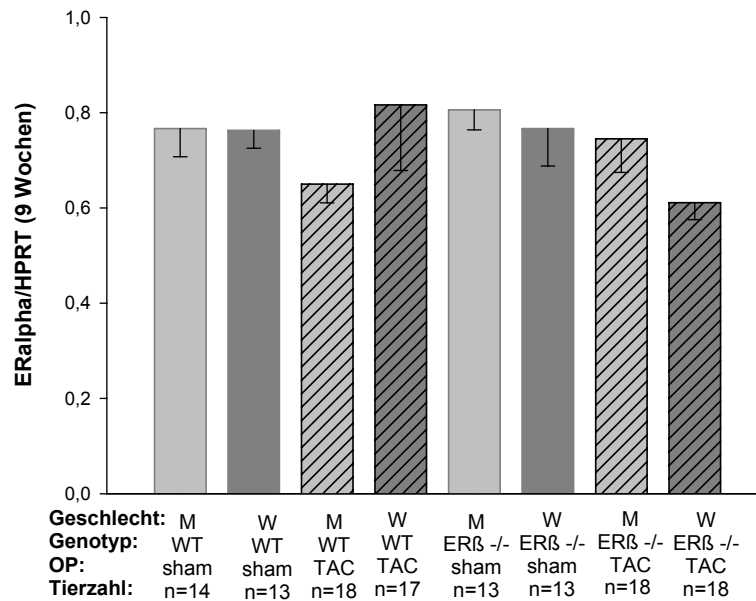


Abbildung 4.15: Darstellung der relativen ERα- Genexpression nach neun Wochen. M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ERβ^{-/-} = Östrogen Rezeptor β Knock- out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P- Wert mit 0,05 an;

4.3 Geschlechterunterschiede in der globalen Genexpression

Biologisch komplexe, molekulare Prozesse lassen sich mittels Mikroarray-Technologie a probat beschreiben. Diese hat in den letzten Jahren eine Vielzahl von Anwendungsgebieten erschlossen und wird sowohl in der Forschung als auch zunehmend in der Diagnostik eingesetzt und bietet die Möglichkeit zur Charakterisierung von komplexen Krankheitsbildern. Mikroarrays zur Analyse des Transkriptoms geben einen Einblick in die globale Genexpression und die Prozessbeteiligung einer Vielzahl von Genen.

In der vorliegenden Studie wurden für die Mikroarray- Analyse jeweils vier Individuen pro Gruppe ausgewählt, diese wiesen ein repräsentatives Expressionsmuster für die Hypertrophiemarker ANP, BNP und Myh7 auf. Jede der Proben wurde einzeln auf einem Affymetrix RAE 430 2.0 GeneChip Array hybridisiert. Die Analyse erfolgte in vier Schritten (Abbildung 4.16). Im ersten Schritt wurde der Einfluss von Geschlecht und Hypertrophie getrennt mit SAM untersucht. Anschließend wurde die Interaktion von Geschlecht und Hypertrophie in jeweils beiden Genotypen untersucht. Die signifikant regulierten Gene/ *probe sets* wurden mittels Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID) und Kyoto Encyclopedia for Genes and Genomes (KEGG) charakterisiert.

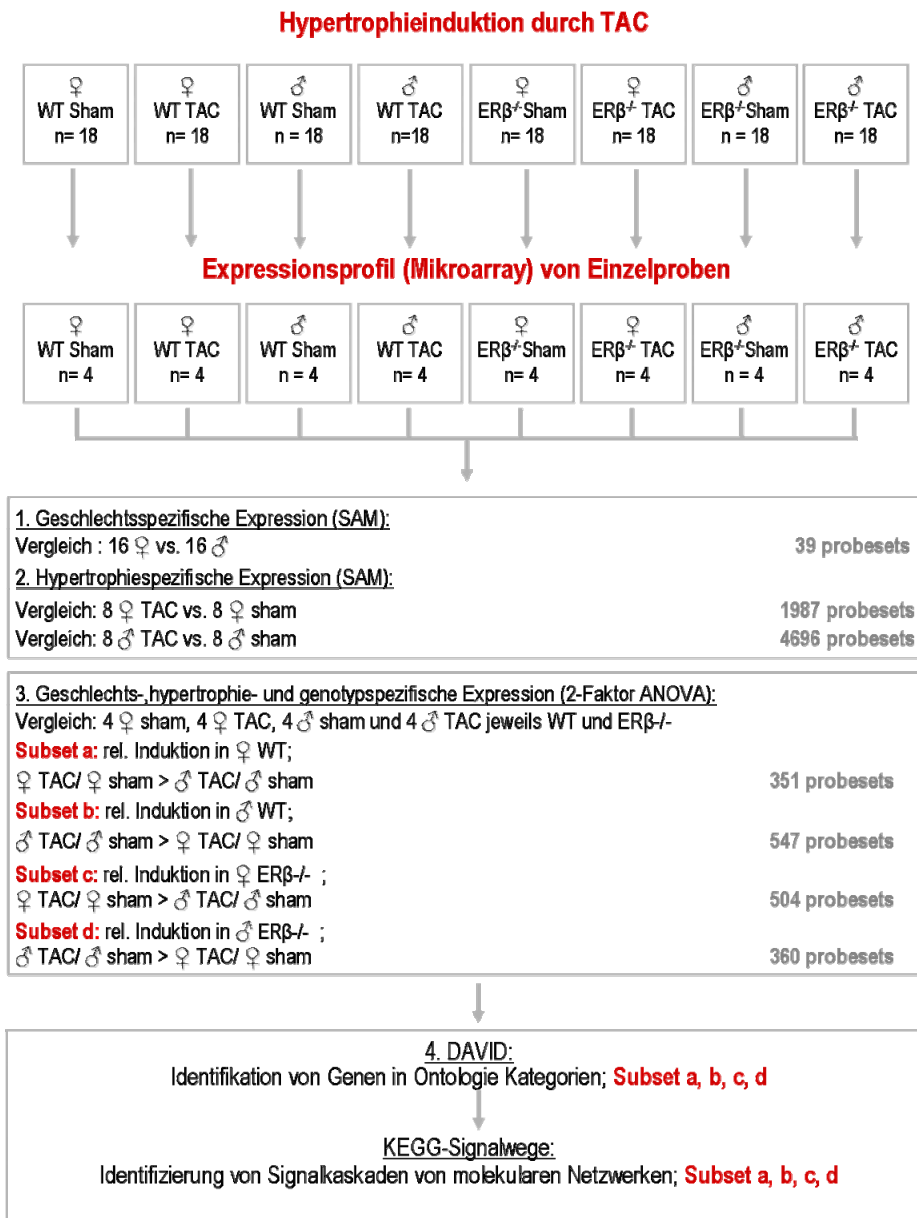


Abbildung 4.16: Design und statistische Analyse des Mikroarray Experiments. Vier individuelle Proben für jede der zu untersuchenden Gruppen wurden auf jeweils einen Affymetrix RAE 430 2.0 GeneChip Array hybridisiert. Die statistische Signifikanz für den Einfluss des Geschlechts und der Hypertrophie wurde mittels Signifikanzanalyse für Mikroarrays (SAM, FDR<1%) berechnet. Die Interaktion von Geschlecht und Hypertrophie in der Expression in WT und ERβ^{-/-} wurde mittels 2-faktorieller ANOVA getestet. Die signifikant regulierten Gene (p<0.05) wurde aufgeteilt in die Subsets a-d. Diese gingen in die weitere Analyse von Gene Ontology Kategorien und KEGG- Signalwegen mittels DAVID ein.

Mittels Signifikanzanalyse für Mikroarrays (SAM) wurde in verschiedenen paarweisen Vergleichen die Anzahl der durch TAC signifikant regulierten Gene berechnet und in Venn-Diagrammen dargestellt. Als Grenzwert zur Definition einer signifikanten Regulation diente eine Falsch-Positiv-Rate (FDR) von 1% respektive 5% (ausgehend von 45101 *probe sets*) (Abbildung 4.17 A-C).

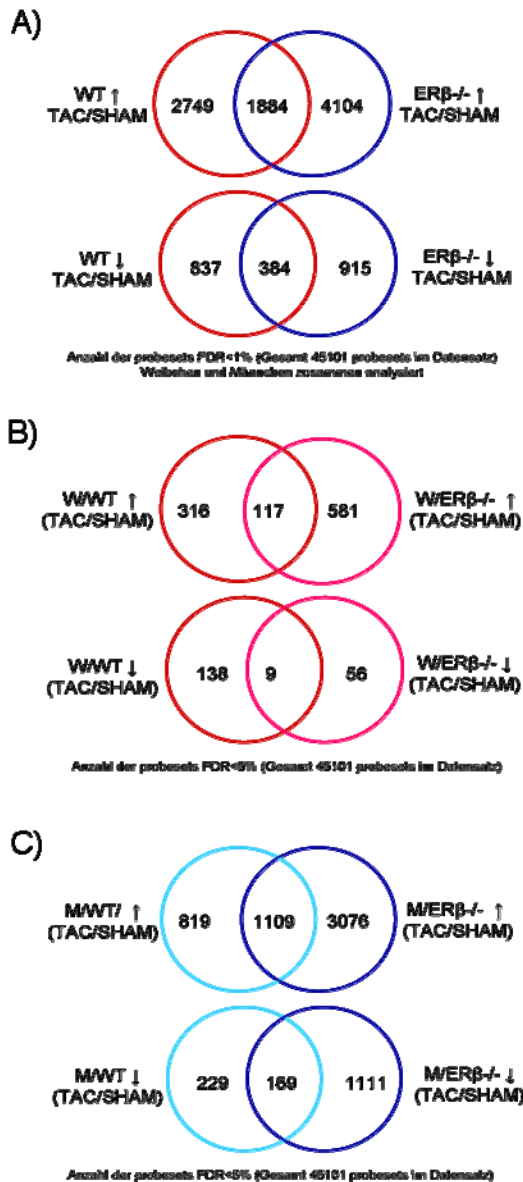


Abbildung 4.17: Darstellung regulierter probe sets/ Gene des linken Ventrikels. Zusammenfassung der Genexpression von WT- Tieren und ERβ^{-/-}- Tieren. Die Kreise repräsentieren die Anzahl der Gene, die in dem Verhältnis TAC vs. Sham signifikant verändert sind. Die linken Kreise stellen die in ihrer Expression induzierten und reduzierten Gene der WT- Tiere im Vergleich TAC vs. Sham dar. Die rechten Kreise stellen die in ihrer Expression induzierten und reduzierten Gene der ERβ^{-/-}- Tiere im Vergleich TAC vs. Sham dar. Die Venn-Diagramme in a) zeigen die regulierten probe sets/ Gene getrennt nach Genotyp, unabhängig vom Geschlecht; b) stellt die Regulation der probe sets der weiblichen Tiere dar und c) zeigt die Regulation der probe sets der männlichen Tiere.

Die Genexpressionsprofile des linken Ventrikels wurden zwischen WT- und ER $\beta^{-/-}$ - Tieren verglichen. Im ersten Vergleich wurden die beiden Genotypen gegenübergestellt A). In beiden Genotypen wurden deutlich mehr Gene in ihrer Expression induziert als vermindert. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Zahl der induzierten Gene in den ER $\beta^{-/-}$ - Tieren wesentlich höher war als in den WT- Tieren (FDR<1%).

Die nächsten Vergleiche zeigten separat die Regulation der *probe sets*/ Gene in weiblichen Tieren B) sowie männlichen Tieren durch TAC-Induktion C). Die Anzahl der induzierten Gene war in beiden Geschlechtern in den ER $\beta^{-/-}$ - Tieren im Vergleich zu den WT- Tieren erhöht. In der Reduktion der Genexpression zeigten sich deutliche Unterschiede im Geschlecht und Genotyp. Die Anzahl der signifikant deregulierten Gene war in den weiblichen ER $\beta^{-/-}$ - Tiere im Vergleich zu den WT- Tieren kleiner, wohingegen die Anzahl der in der Expression reduzierten Gene in den männlichen ER $\beta^{-/-}$ - Tieren im Vergleich zur WT- Gruppe sehr viel höher war.

4.3.1 Regulation der typischen Hypertrophiemarker

Zunächst wurden die Effekte der TAC-Induktion auf die Expression klassischer Hypertrophiemarker in den einzelnen Gruppen analysiert (Abbildung 4.18). Dafür wurde jeweils die Expression im Vergleich zur Gruppe mit gleichem Genotyp und Geschlecht betrachtet. Typische Hypertrophiemarker, wie α -skeletales Aktin, natriuretisches Peptid Präkursor A (ANP), natriuretisches Peptid Präkursor B (BNP), Prokollagen Typ IV, Connective tissue growth factor (CTGF) und Transforming Growth Faktor (TGF) wurden in allen Gruppen nach TAC signifikant induziert. SERCA und PGC-1 α wurden bei Hypertrophie reprimiert. Die Falsch-Positiv-Rate nach SAM betrug für TAC vs. Sham < 1%.

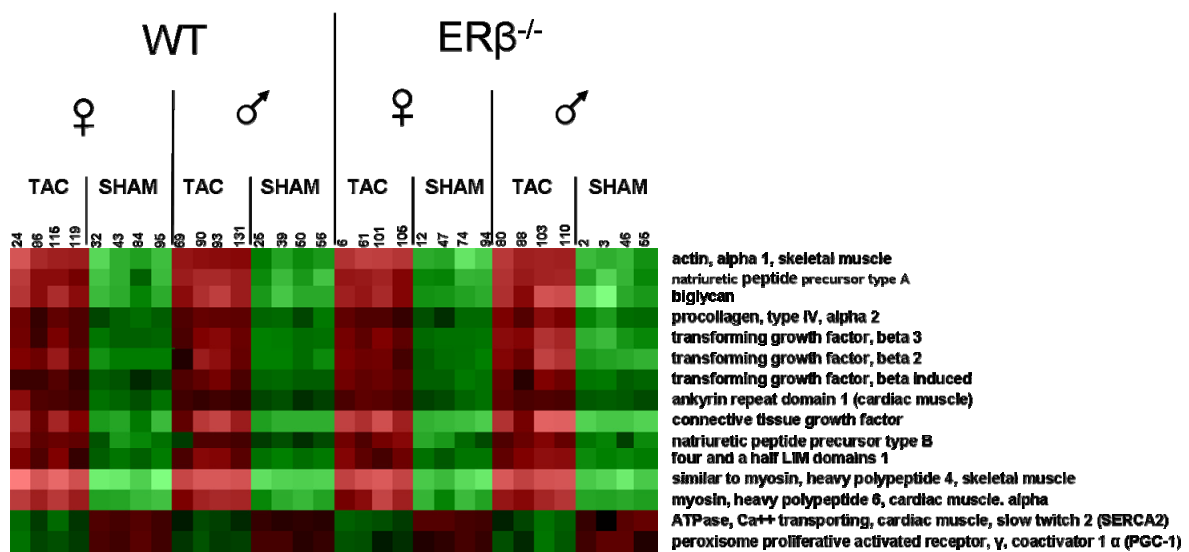


Abbildung 4.18: Grafische Darstellung der induzierten Hypertrophiemarker. Es wurde für jeden Expressionswert eines Gens das Verhältnis zum Mittelwert der Vergleichsgruppe gleichen Genotyps und Geschlechts berechnet. Eine relative Induktion der Expression ist rot und eine relative Reduktion grün dargestellt. Schwarz zeigt eine gleich starke Expression an, Eine hellere Darstellung der Farben stellt eine stärkere Induktion oder Repression dar.

4.3.2 Differentielle Genexpression zwischen männlichen und weiblichen Tieren

In einer kleinen Gruppe von Genen konnte eine unterschiedliche Genexpression zwischen den Geschlechtern unabhängig von der Induktion durch TAC und Genotyp gezeigt werden. Insbesondere Gene der X-degenerierten Region des Y Chromosoms wurden gefunden. Entsprechende Unterschiede ergeben sich aus den detektierten geschlechtsspezifischen Varianten der X- und Y- Chromosomen; von einer unterschiedlichen Expression im biologischen Sinn (aktives Protein) ist hier grundsätzlich nicht auszugehen. Die Falsch-Positiv-Rate nach SAM Statistik betrug für Weibchen vs. Männchen < 5%.

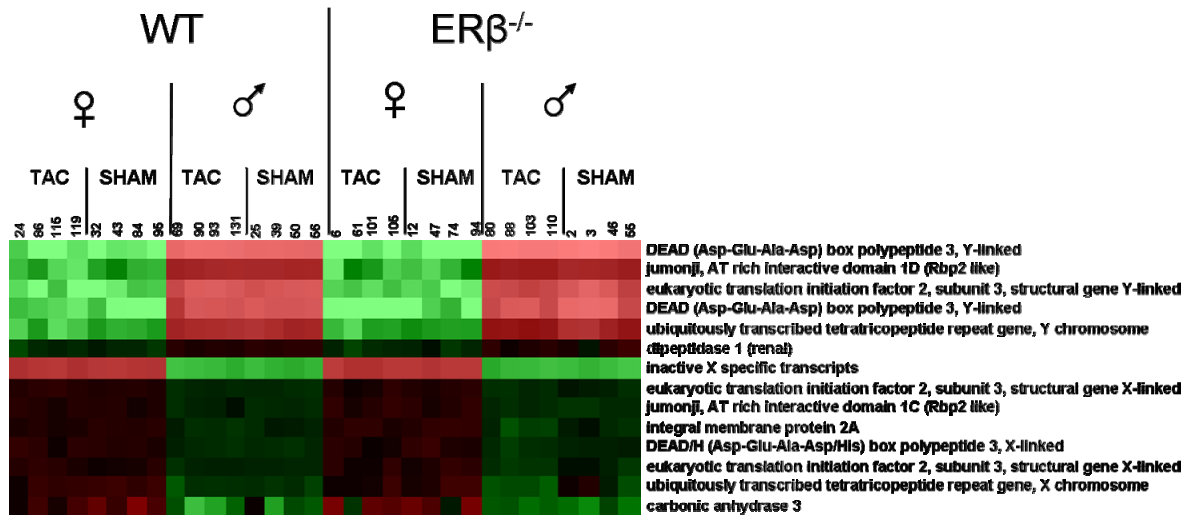


Abbildung 4.19: Grafische Darstellung der geschlechtsspezifischen Expression. Es wurde für jeden Expressionswert eines Gens das Verhältnis zum Mittelwert der Vergleichsgruppe gleichen Genotyps und gleicher Behandlung berechnet. Eine relative Induktion der Expression ist rot und eine Reduktion grün dargestellt. Schwarz zeigt eine gleich starke Expression an. Eine hellere Darstellung der Farben stellt eine stärkere Induktion oder Repression dar.

4.3.3 Geschlechtsspezifische Regulation biologischer Prozesse bei Myokardhypertrophie

Es wurde jeweils in den Genotypen getrennt mittels 2-Faktor ANOVA auf Interaktion von Geschlecht (männlich und weiblich) und Hypertrophie (TAC und sham) auf Grundlage der Expressionswerte der *probe sets* getestet. Als Grenzwert für eine signifikante Interaktion wurde $p < 0.05$ definiert. Bei den WT- Mäusen waren 898 *probe sets* signifikant dereguliert und bei den $ER\beta^{-/-}$ Mäusen 864. Das Verhältnis aus TAC/sham der männlichen und weiblichen Tiere wurde miteinander verglichen, um den Einfluss des Geschlechts in diesen beiden Sätzen von Genen besser charakterisieren zu können. Für (TAC/sham männlich) $>$ (TAC/Sham weiblich) wurde das erhaltene Subset als relativ stärker in männlichen Mäusen und für (TAC/Sham männlich) $<$ (TAC/Sham weiblich) als relativ stärker in weiblichen Mäusen exprimiert definiert (Abbildung 4.16). Beispielsweise kann relativ stärker exprimiert in weiblichen Tieren bedeuten: eine stärkere Induktion der Expression durch TAC, eine schwächere Repression in der Expression durch TAC oder eine gegenläufige Expression in Abhängigkeit von TAC.

Diese 4 Subsets (je zwei pro Genotyp) wurden anschließend in Hinblick auf die Präsenz der enthaltenen Gene in *Gene Ontology* Kategorien (Ebene 3) und KEGG– Signalwegen mit DAVID analysiert. Hierbei wurde mit einem Fisher's exakten Test auf eine mögliche Überrepräsentation getestet.

In den weiblichen WT- Tieren nach Induktion einer Aortenstenose waren hauptsächlich Gene relativ stärker exprimiert, die in verschiedenen biologischen Prozessen des

Metabolismus eine Rolle spielen. Dazu gehören beispielsweise Proteinmetabolismus, Transport, zellulärer Makromolekülmetabolismus und Regulation des Zellmetabolismus.

In der Ebene 3 der Baumstruktur „zelluläre Komponente“ zeigten die Kategorien intrazellulärer Bereich, vor allem aber das Mitochondrium und die innere und äußere Mitochondrienmembran die stärkste Anreicherung an Genen. Viele Gene dieser zellulären Komponente wurden dem KEGG- Signalweg der oxidativen Phosphorylierung zugeordnet. In der genaueren Analyse des Datensets konnte festgestellt werden, dass Gene aus den einzelnen Komplexen der oxidativen Phosphorylierung reduziert waren, jedoch ein Geschlechterunterschied festgestellt werden konnte: in den weiblichen Tieren war die Reduktion weniger stark ausgeprägt als in den männlichen Tieren (siehe Abbildung 4.20). Dazu zählen die Gene: NDUF5 (Komplex I- NADH Dehydrogenase), NDUF4S (Komplex I- NADH Dehydrogenase), COX7A (Komplex IV- Cytochrom C Oxidase), COX10 (Komplex IV- Cytochrom C Oxidase), ATP5K (Komplex 5 ATP-Synthase). Diese geschlechtsspezifische Expression nach TAC konnte mittels RT-PCR validiert werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4.2: Darstellung der spezifischen GO-Kategorien weiblicher WT-Tiere nach TAC-Induktion.

	Kategorie/Signalweg	Anzahl der <i>probe sets</i>	P-Wert
Biologischer Prozess	Nukleinbasen, Nukleoside, Nukleotide,	67	0,003
	Biopolymermetabolismus	85	0,003
	Membranorganisation und Biogenese	11	0,004
	Regulation der Genexpression	48	0,004
	Regulation metabolischer Prozesse	50	0,018
	Regulation Zellmetabolismus	48	0,022
	Elektronentransport	12	0,05
	Oxidative Phosphorylierung	4	0,08
Zelluläre Komponente	intrazellulärer Bereich	182	1,18E-09
	Mitochondrium	33	0,0001
	innere Mitochondrienmembran	11	0,02
	mitochondriale Membran	11	0,03
KEGG- Signalweg	Oxidative Phosphorylierung (mmu00190)	9	0,001

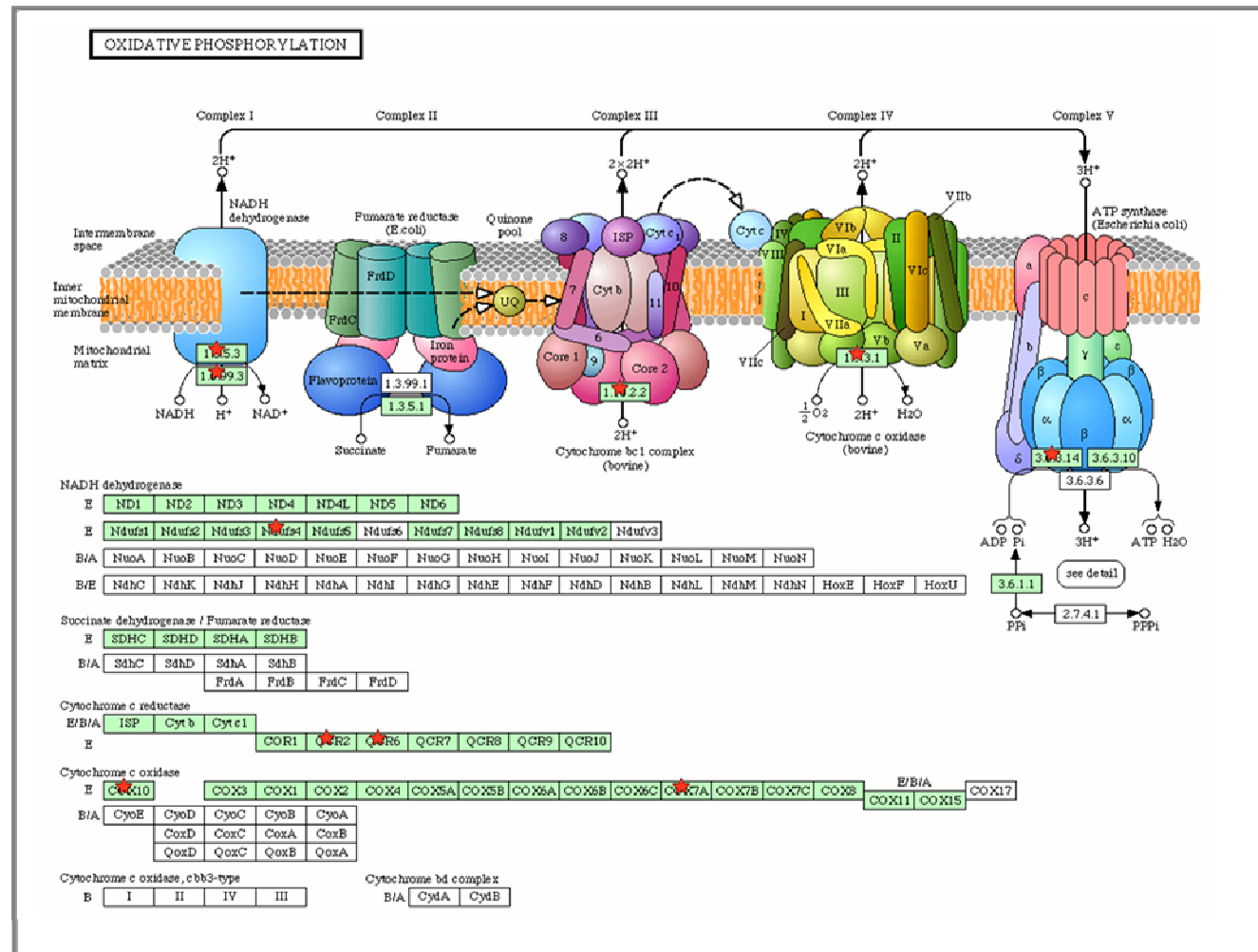


Abbildung 4.20: Darstellung der regulierten Gene in der oxidativen Phosphorylierung. Rote Sterne zeigen Gene mit einer relativ stärkeren Expression in den weiblichen WT Tieren nach TAC an ($p < 0.05$)

In den männlichen WT- Tieren nach TAC Induktion waren hauptsächlich Gene relativ stärker exprimiert, die mit Umbauprozessen des Gewebes (Remodeling) assoziiert sind (Tabelle 4.3). In der Einordnung „zelluläre Komponente“ zeigten die Kategorien intrazellulärer Bereich, Zytoplasma und der Nukleus die stärkste Anreicherung an Genen. Viele Gene dieser zellulären Komponente wurden den KEGG- Signalwegen MAPK (*Mitogen activated protein kinase*)- Signalweg und dem Adherens Junction (Adhäsionsverbindungen) -Signalweg zugeordnet. Dazu gehören beispielsweise folgende Gene: MAPK 6, FGF (*fibroblast growth factor*), Filamin, Actin und Catenin. Die Expressionen dieser Gene waren in den männlichen Tieren relativ stärker exprimiert als in den weiblichen Tieren.

Tabelle 4.3: Darstellung der spezifischen GO-Kategorien männlicher WT-Tiere nach TAC-Induktion.

	Kategorie/Signalweg	Anzahl der probe sets	P-Wert
Biologischer Prozess	Regulation Zellmetabolismus	128	0,000003
	Regulation Zellproliferation	24	0,00002
	Negativregulation zellulärer biologischer Prozesse	42	0,0004
	Anatomische Strukturmorphogenese	486	0,0007
	Nukleinbasen, Nukleoside, Nukleotide,	107	0,001
	Regulation Signaltransduktion	21	0,004
	Muskelfaser Entwicklung	7	0,0506
	Organmorphogenese	20	0,039
Zelluläre Komponente	intrazellulärer Bereich	256	0,0000004
	Zytoplasma	173	0,00002
	Zytoskelett	38	0,002
	Nukleus	125	0,003
KEGG- Signalweg	MAPK Signalweg (mmu04010)	14	0,02
	Adhärenz junction Signalweg (mmu04520)	7	0,02

In den weiblichen $ER\beta^{-/-}$ - Tieren nach Induktion einer TAC wurden hauptsächlich Gene stärker exprimiert, deren biologische Prozesse in Umbauprozessen, dem so genannten Remodeling, vorzufinden sind (Tabelle 4.4). In der zellulären Komponente zeigten der intrazelluläre Bereich sowie der Zellkern die stärkste Anreicherung an Genen. Die größte Anzahl der signifikant regulierten Gene konnte der *Wnt*- Signalkaskade und der p53- Signalkaskade zugeordnet werden. Dazu gehörten beispielsweise Gene, wie *MAPK8*, *Wnt* – Inhibitor Faktor 1, *Creb*- Bindeprotein und Tensin- Homologe.

Tabelle 4.4: Darstellung der spezifischen GO-Kategorien der weiblichen ER $\beta^{-/-}$ -TAC-Tiere.

	Kategorie/Signalweg	Anzahl der <i>probe sets</i>	P-Wert
Biologischer Prozess	Biopolymermetabolismus	160	>0,00000001
	Regulation zellulärer Prozesse	127	>0,00000001
	Nukleinbasen, Nukleoside, Nukleotide, Nukleinsäuremetabolismus	117	>0,00000001
	Regulation Transkription	82	0,000006
	Negativregulation zellulärer Prozesse	38	0,0003
	Negativregulation zellulärer biologischer Prozesse	38	0,0009
	Regulation Zellzyklus	18	0,003
	Organellenorganisation und Biogenese	41	0,005
Zelluläre Komponente	intrazellulärer Bereich	246	>0,00000001
	intrazelluläre membrangebundene Organelle	195	>0,00000001
	Nukleus	14538	>0,00000001
	Ubiquitin Ligase Komplex	5	0,02
KEGG- Signalweg	Wnt Signalweg (mmu04310)	14	0,02
	p53 Signalweg (mmu04115)	7	0,02

Die männlichen ER $\beta^{-/-}$ - Tiere wiesen neun Wochen nach TAC-Induktion ein anderes globales Expressionsmuster auf als die weiblichen Vergleichstiere. In der Baumstruktur „zelluläre Komponente“ zeigten die Kategorien intrazellulärer Bereich, Zytoplasma, intrazelluläre membrangebundene Organelle und der Zellkern die größte Anreicherung von Genen. Es konnte eine stärkere Expression von Genen beobachtet werden, die Apoptose- assoziiert sind. Diese konnten darüber hinaus dem KEGG- Signalweg „DRPLA“ zugeordnet werden. Es wurden Apoptose- assoziierte Gene, wie Kaspase 7, Kaspase 9 und AIP (Apoptose induzierendes Protein) induziert.

Tabelle 4.5: Darstellung der spezifischen GO-Kategorien der männlichen ER β ^{-/-}TAC-Tiere

	Kategorie/Signalweg	Anzahl der probe sets	P-Wert
Biologischer Prozess	Biopolymermetabolismus	102	0,00006
	Regulation zellulärer Prozesse	99	0,000000009
	Nukleinbasen, Nukleoside, Nukleotide,	76	0,0009
	Negativregulation biologischer Prozesse	32	0,0002
	Regulation Zellproliferation	16	0,001
	Regulation programmierter Zelltod	16	0,006
	Zellzyklus	18	0,011
	Zelltod	18	0,05
Zelluläre Komponente	intrazellulärer Bereich	178	0,00000008
	Zytoplasma	122	0,00001
	intrazelluläre membrangebundene Organelle	131	0,004
	Nukleus	86	0,004
KEGG- Signalweg	Dentatorubropallidolusian Atrophie (DRPLA)	3	0,02
	Chronische Myeloische Leukämie (mmu05220)	5	0,04

Zusammenfassende Resultate der Mikroarray- Analyse

Die Analyse der Mikroarray- Daten ergab für die untersuchten Gruppen ein spezifisches globales Expressionsmuster nach Induktion einer TAC nach neun Wochen. Tabelle 4.6 stellt vereinfacht dar, welche biologischen Prozesse im Hinblick auf die Hypertrophie aufgrund ihrer relativ höheren Genexpression in den TAC- Gruppen charakteristisch waren.

Tabelle 4.6: Darstellung der gruppenspezifischen biologischen Prozesse neun Wochen nach TAC.

Gruppe (9W)	Biologischer Prozess
W WT TAC	Metabolismus
M WT TAC	Remodeling
W ER β ^{-/-} TAC	Remodeling
M ER β ^{-/-} TAC	Apoptose

4.4 Geschlechtsspezifische Mechanismen bei Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz: Regulation des myokardialen Stoffwechsels

Der kardiale Stoffwechsel wird unter anderem von den PPAR- Isoformen sowie dem Ko-Faktor PGC-1 α gesteuert. Die Expression dieser Proteine und deren Zielgene sowie

deren Produkte wurden zwei und neun Wochen nach Intervention in den Tieren analysiert, um den veränderten Stoffwechsel bei kardialer Hypertrophie zu determinieren. Die Zielgene der PPAR- Isoformen sind weitgehend Enzyme mit wichtigen Funktionen im Fettsäurenimport oder der Fettsäurenbindung. Sie sind an limitierenden Schritten der β -Oxidation beteiligt. Dazu gehören CD36, CPT1, ACOX und MCAD. Darüber hinaus wurden die Genexpressionen der wichtigsten kardialen Glukosetransporter GLUT1 und GLUT4 untersucht.

4.4.1 Verminderte PPAR α - Proteinexpression bei Myokardhypertrophie

In der frühen Phase der Hypertrophie war die relative Proteinexpression von PPAR α in fast allen Tiergruppen nach TAC- Induktion signifikant reduziert. Die weiblichen WT- Tiere zeigten nach TAC keine reduzierte PPAR α - Expression, die Expression blieb nahezu unverändert. Damit unterscheidet sich die Expression von PPAR α signifikant im Vergleich zur männlichen Gruppe (Abbildung 4.21 A).

In der späten Phase der Hypertrophie ist dieser Geschlechterunterschied nicht mehr vorhanden (Abbildung 4.18 B). Die Expression von PPAR α war in allen untersuchten Gruppen nach TAC- Induktion signifikant vermindert. Die Proteinexpression blieb sowohl in der frühen als auch späten Phase der Myokardhypertrophie unbeeinflusst vom Genotyp.

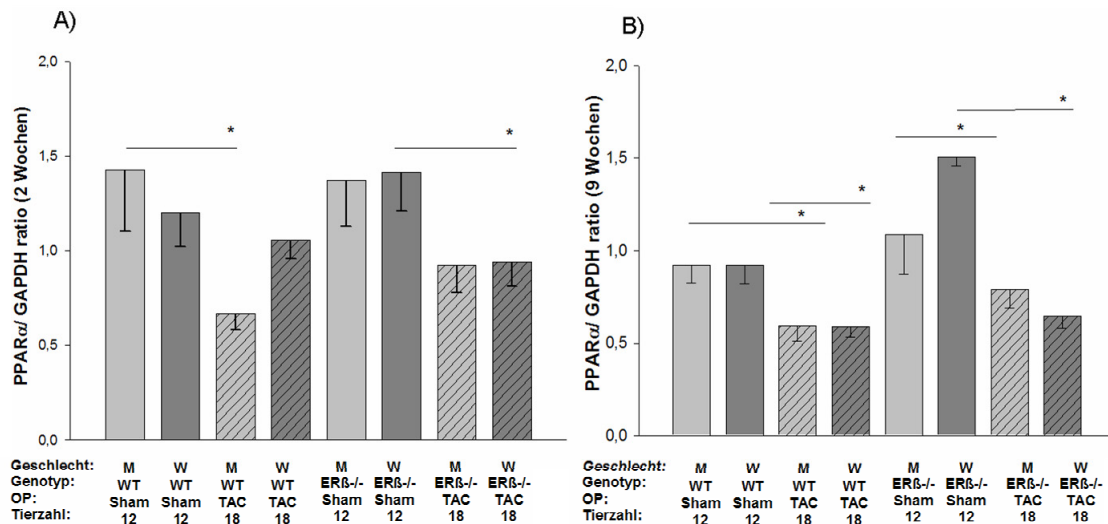


Abbildung 4.21: A) Proteinexpression von PPAR α im myokardialen Gewebe nach zwei Wochen; B) Proteinexpression von PPAR α im myokardialen Gewebe nach neun Wochen. M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ER β ^{-/-} = Östrogen Rezeptor β Knock- out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P- Wert mit 0,05 an.

4.4.2 Reduktion der PPAR β/δ - Proteinexpression in kardialer Hypertrophie

Die relative Proteinexpression von PPAR β/δ zeigte in den weiblichen WT- und den männlichen ER β ^{-/-} Tieren zwei Wochen nach TAC eine signifikante Reduktion gegenüber

den entsprechenden Kontrollgruppen. Der Genotyp hatte einen deutlichen Einfluss auf die PPAR β/δ - Expression. Grundsätzlich war die Proteinexpression von PPAR β/δ in den ER $\beta^{-/-}$ - Tieren im Vergleich zu den WT- Tieren in allen Tiergruppen signifikant reduziert. Zugunsten besserer Übersichtlichkeit wurde hier auf das Eintragen der Signifikanzzeichen verzichtet (Abbildung 4.22 A).

Neun Wochen nach TAC blieb der Genotypeffekt erhalten: Die Expression sank in den männlichen und weiblichen WT- sowie den weiblichen ER $\beta^{-/-}$ - Tieren nach TAC gegenüber den entsprechenden Kontrollgruppen signifikant. Dagegen war die Expression von PPAR β/δ in den weiblichen scheinoperierten ER $\beta^{-/-}$ - Tieren im Vergleich zur männlichen Kontrollgruppe erhöht und erfuhr nach der TAC- Induktion eine Reduktion in der Proteinexpression. Die männlichen Tiere dieser Gruppen zeigten keine Veränderungen. Daraus folgte ein zusätzlicher Geschlechterunterschied im späten Stadium der Hypertrophieentwicklung (Abbildung 4.22 B).

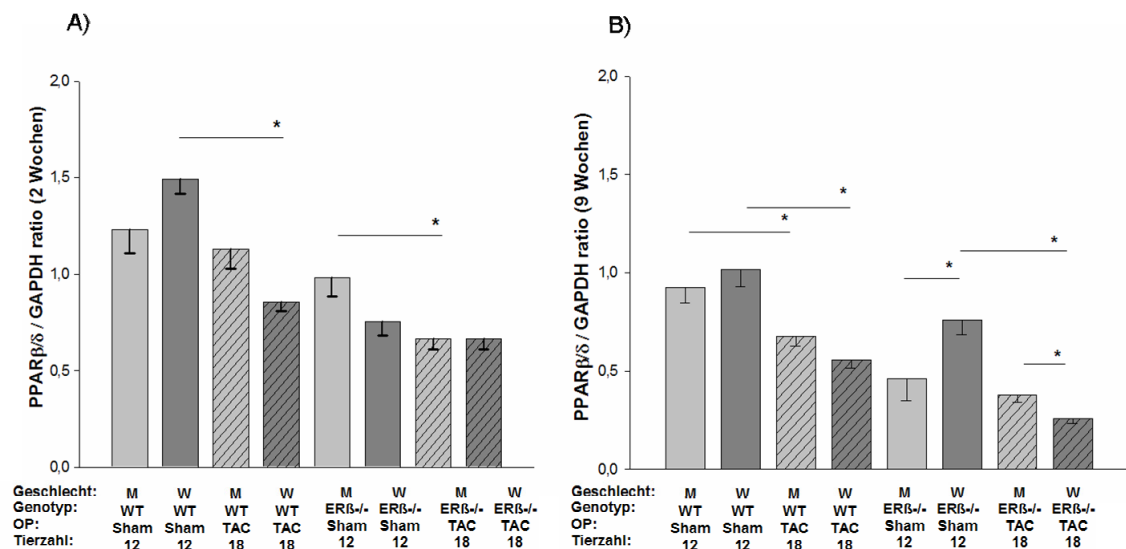


Abbildung 4.22: A) Proteinexpression von PPAR β/δ im myokardialen Gewebe nach zwei Wochen; B) Proteinexpression von PPAR β/δ im myokardialen Gewebe nach neun Wochen. M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ER $\beta^{-/-}$ = Östrogen Rezeptor β Knock- out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P- Wert mit 0,05 an.

4.4.3 Geschlechterunterschiede in der PPAR γ - Proteinexpression

Zwei Wochen postoperativ wurde in der PPAR γ - Proteinexpression ein Geschlechterunterschied in den scheinoperierten WT- Tieren beobachtet. Die Expression von PPAR γ in den weiblichen Tieren war gegenüber den männlichen Tieren signifikant erhöht. In den anderen Versuchsgruppen war keine Veränderung der Proteinexpression festzustellen (Abbildung 4.23 A).

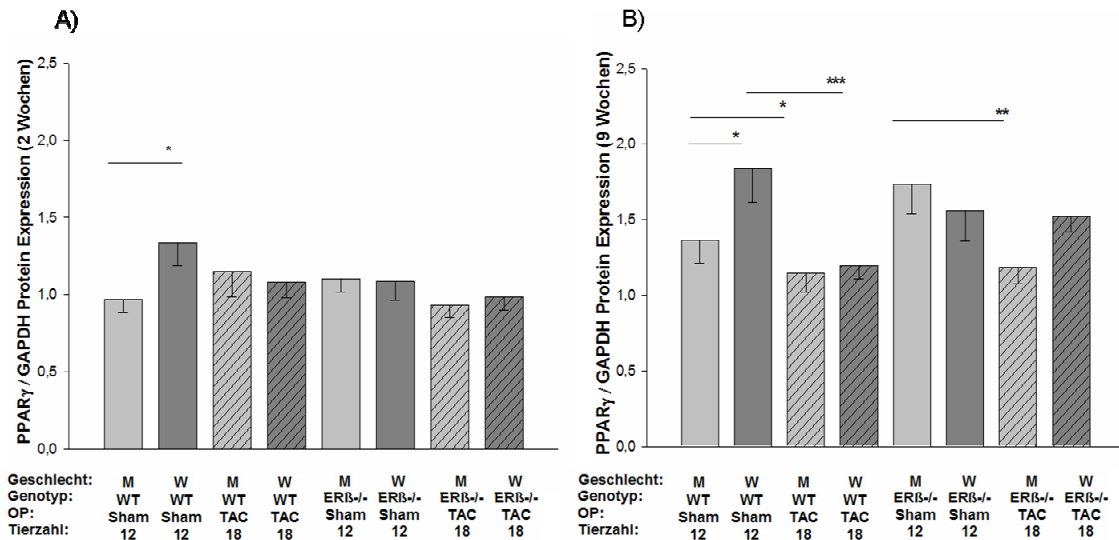


Abbildung 4.23: A) Proteinexpression von PPAR γ im myokardialen Gewebe nach zwei Wochen; B) Proteinexpression von PPAR γ im myokardialen Gewebe nach neun Wochen. M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ER $\beta^{-/-}$ = Östrogen Rezeptor β Knock- out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P- Wert mit 0,05 an; ** gibt den P- Wert mit 0,01 an.

Nach neun Wochen blieb dieser Geschlechterunterschied in der PPAR γ - Expression der scheinoperierten WT- Tiere erhalten. Die Proteinexpression nach TAC war in beiden Geschlechtern der WT- Gruppen reduziert, die weiblichen Tiere zeigten eine hochsignifikante Verminderung. In den ER $\beta^{-/-}$ - Gruppen reduzierte sich die Expression ausschließlich in den männlichen Tieren nach TAC. Die anderen Gruppen wiesen keine veränderte Proteinexpression auf (Abbildung 4.23 B)

4.4.4 Geschlechterunterschiede in PGC1- α - Proteinexpression und Genexpression

Zwei Wochen postoperativ war in der PGC-1 α - Proteinexpression keine Veränderung festzustellen (Abbildung 4.24 A). Im Gegensatz dazu zeigte sie zum Neun- Wochen- Zeitpunkt starke Veränderungen und war in weiblichen scheinoperierten Tieren im Vergleich zur männlichen Kontrollgruppe erhöht. Eine Reduktion von PGC-1 α konnte nach TAC- Induktion in beiden Geschlechtern beobachtet werden. Die männlichen ER $\beta^{-/-}$ - Tiere kennzeichnete eine signifikante Verminderung der Expression nach TAC (Abbildung 4.24 B).

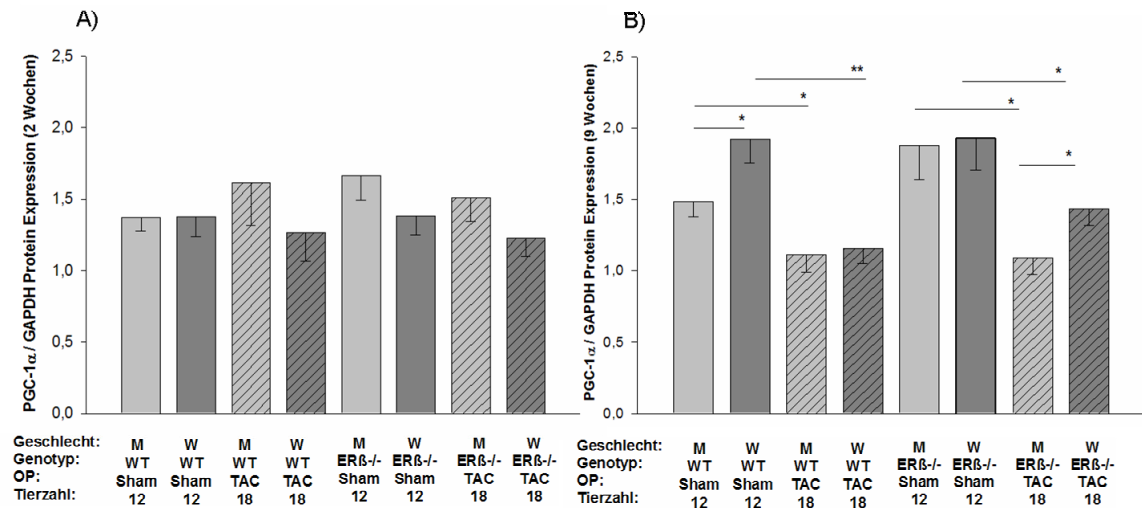


Abbildung 4.24: A) Proteinexpression von PGC-1α im myokardialen Gewebe nach zwei Wochen; B) Proteinexpression von PGC-1α im myokardialen Gewebe nach neun Wochen. M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ERβ^{-/-} = Östrogen Rezeptor β Knock- out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P- Wert mit 0,05 an; ** gibt den P- Wert mit 0,01 an.

Die Genexpression von PGC-1α unterschied sich zum Zwei- Wochen- Zeitpunkt von der Proteinexpression. Diese wies keine Veränderungen auf, während die Genexpression von PGC-1α in allen Tiergruppen mit Hypertrophie reduziert war. Es wurden keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern oder Genotypen beobachtet (Abbildung 4.25 A).

In der späten Phase der Hypertrophie stimmte die Genexpression von PGC1α mit der Proteinexpression überein (Abbildung 4.25 B). Die scheinoperierten Tiere wiesen in der Genexpression einen Geschlechterunterschied auf. Eine Verminderung der Genexpression bei Hypertrophie konnte beobachtet werden. Die beobachteten Effekte waren jedoch nicht so stark ausgeprägt wie in der Proteinexpression.

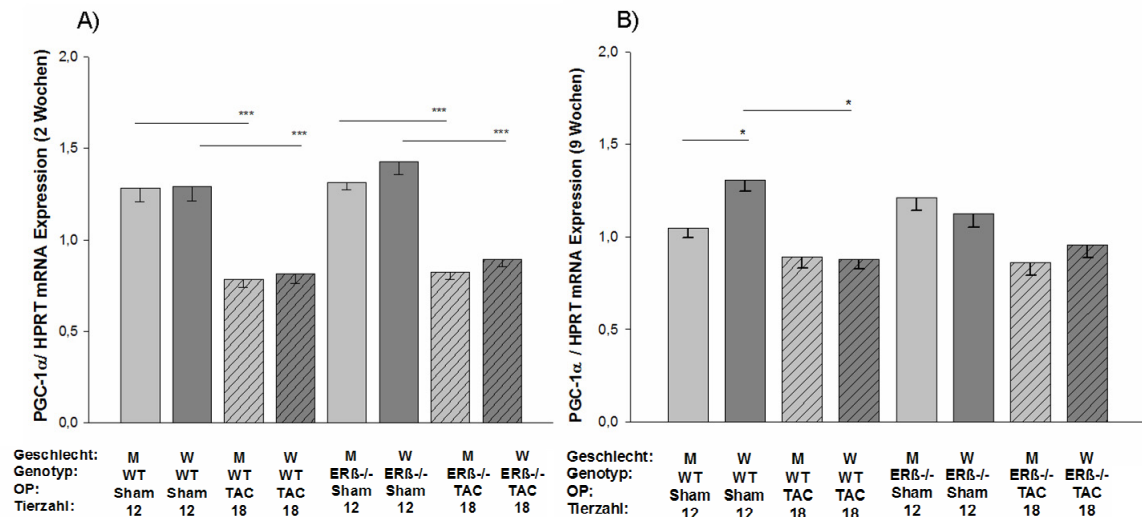


Abbildung 4.25: A) Genexpression von PGC-1α im myokardialen Gewebe nach zwei Wochen; B) Genexpression von PGC-1α im myokardialen Gewebe nach neun Wochen. M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ERβ^{-/-} = Östrogen Rezeptor β Knock- out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P- Wert von 0,05 an;*** gibt den P- Wert mit 0,001 an.

4.4.5 Verminderte Genexpression der PPAR- Zielgene

Die unterschiedlichen Protein- und mRNA- Expressionsmuster der Regulatoren warfen die Frage auf, ob deren Zielgene entsprechend exprimiert wurden. PPAR- Zielgene sind vor allem Enzyme, die am Fettsäureimport sowie der Fettsäureoxidation beteiligt sind. Dazu wurden in dieser Studie die mRNA- Expressionen von CD36, ACOX, CPT1, MCAD und anderer bekannter Zielgene untersucht. Die grafische Darstellung erfolgte exemplarisch für CD36 und ACOX (Abbildung 4.26 A- D).

Die CD36- Genexpression war zum Zwei- Wochen- Zeitpunkt in den TAC- Tieren reduziert (A). Diese Reduktion war ohne Einfluss durch Geschlecht oder Genotyp und blieb nach neun Wochen in den WT- TAC- Tieren erhalten (B). Diese blieb jedoch in den ERβ^{-/-}- Tieren aus. Hier zeigte sich im Vergleich eine verminderte Genexpression der weiblichen Tiere gegenüber den männlichen Individuen nach neun Wochen. Die Genexpression von ACOX äußerte sich zum frühen Zeitpunkt ebenfalls in einer signifikanten Reduktion (C), diese war nach neun Wochen nur noch tendenziell zu beobachten (D). Es zeigten sich weder Geschlechterunterschiede noch Unterschiede im Genotyp.

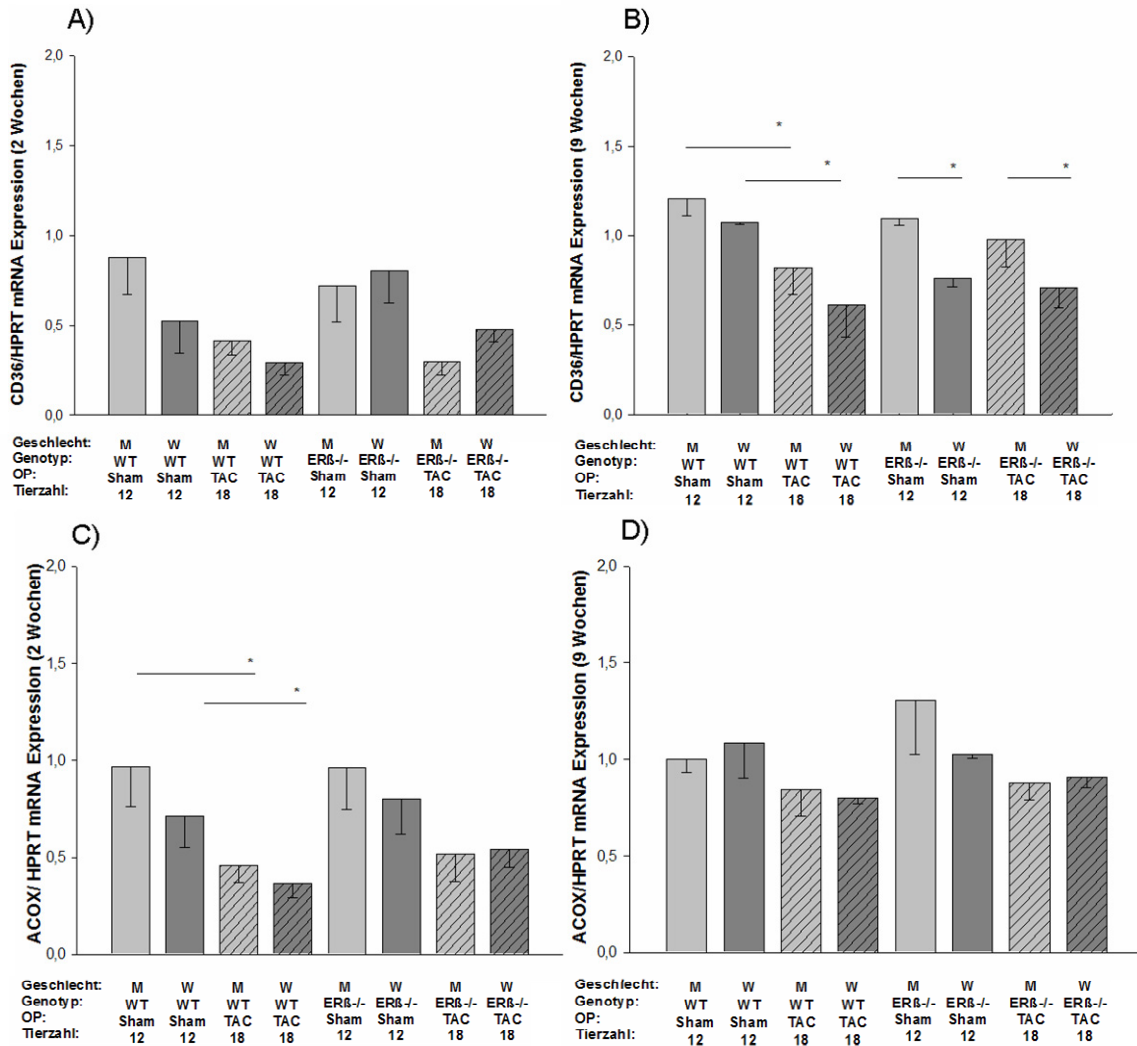


Abbildung 4.26: A) Genexpression von CD36 nach zwei Wochen; B) Genexpression von CD36 nach neun Wochen; C) Genexpression von ACOX nach zwei Wochen; D) Genexpression von ACOX im myokardialen Gewebe nach neun Wochen. M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ERβ^{-/-} = Östrogen Rezeptor β Knock- out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P- Wert mit 0,05 an.

Die Expressionen weiterer am Fettstoffwechsel beteiligter Gene, wie CPT1 und MCAD, wiesen ähnliche Expressionsmuster wie ACOX auf. Diese Expressionen waren nach TAC- Induktion stark vermindert und blieben vom Geschlecht und Genotyp unbeeinflusst.

4.4.6 Einfluss von Geschlecht und Genotyp auf den Glukosestoffwechsel

Die Genexpression des insulinabhängigen Glukosetransporters GLUT4 veränderte sich zum Neun- Wochen- Zeitpunkt nicht (Abbildung 4.27 A). Dagegen konnte in der Genexpression des insulinunabhängigen Transporters GLUT1 ein Abfall in der Genexpression nach TAC in fast allen Gruppen beobachtet werden, lediglich die weiblichen WT- Tiere zeigten neun Wochen nach TAC keine entsprechende

Verminderung (Abbildung 4.27 B). Damit konnte in den WT- Tieren mit Myokardhypertrophie ein Geschlechterunterschied in der GLUT1- mRNA- Expression demonstriert werden. Dieser blieb in den Tieren mit ER β - Deletion aus.

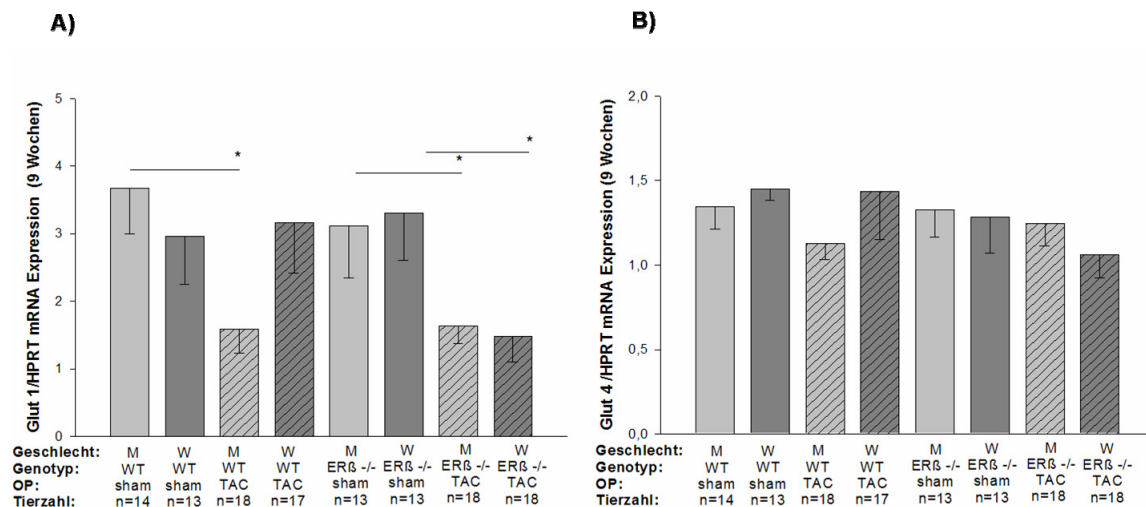


Abbildung 4.27: A) Genexpression von GLUT1 im myokardialen Gewebe nach neun Wochen; B) Genexpression von GLUT4 im myokardialen Gewebe nach neun Wochen im kardialen Gewebe. M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ER β ^{-/-} = Östrogen Rezeptor β Knock- out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P- Wert mit 0,05 an.

Zusammenfassung zur Untersuchung der Regulation des kardialen Stoffwechsels in der Hypertrophieentwicklung

Die Regulation des myokardialen Stoffwechsels oblag hinreichenden Veränderungen in der Protein- und Genexpression seiner Regulatoren und ihrer Zielgene während der Entwicklung einer Hypertrophie und der Progression in die Herzinsuffizienz. Die Untersuchung der PPAR- Isoformen und ihrer Zielgene äußerte sich zum späten Zeitpunkt, der maladaptiven Hypertrophie, hauptsächlich in einer Reduktion ihrer Expression. In der frühen adaptiven Phase der Hypertrophieentwicklung konnten sehr unterschiedliche Effekte in der Expression der PPAR- Isoformen beobachtet werden. Die Proteinexpression von PPAR α war in fast allen TAC- Gruppen reduziert, lediglich die weiblichen WT- Tiere zeigten keine Veränderung in der Expression. Die PPAR β/δ - Proteinexpression war in der WT- Gruppe nach TAC- Induktion nur in den weiblichen Tieren vermindert. In den ER β ^{-/-} Tieren war die Expression von PPAR β/δ nur in den männlichen Tieren nach TAC reduziert.

Die Proteinexpressionen von PPAR γ und PGC-1 α wiesen im adaptiven Stadium der Hypertrophie keine starken Veränderungen auf. Eine Auffälligkeit zeigte sich jedoch in der PPAR γ - Proteinexpression nach zwei Wochen. Hier konnte ein Geschlechterunterschied in den scheinoperierten Tieren beobachtet werden.

Hervorzuheben ist an dieser Stelle, dass nur zu dem späten Zeitpunkt in der Expression von PPAR α , PPAR γ und PGC-1 α scheinooperierter Tiere ein Geschlechterunterschied festgestellt wurde. Ein Einfluss des Genotyps konnte ausschließlich in der Expression von PPAR β/δ beobachtet werden. Die Genexpressionen der Zielgene zeichneten sich durch eine Reduktion bei Hypertrophie aus.

Der kardiale Glukosestoffwechsel, charakterisiert durch die Genexpressionen von GLUT1 und GLUT4, zeigte bei Hypertrophie nur einen Einfluss auf die GLUT1- Genexpression: Bei Hypertrophie war eine Verminderung der Expression in den TAC- Gruppen zu beobachten. Lediglich in den weiblichen WT- Tieren nach TAC blieb die Expression von GLUT1 unbeeinflusst. Die Genexpressionen des Glukosetransporters GLUT4 zeigten interindividuelle Schwankungen auf, jedoch keine signifikanten Veränderungen.

Geschlechtsspezifische Mechanismen bei Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz: Umbau der EZM

Zur Beschreibung struktureller Veränderungen des Myokards wurden Gewebeschnitte der linken Ventrikel der Tiere histologisch auf kardiale Fibrosebildung untersucht.

Die Genexpressionen von Enzymen bzw. Komponenten der extrazellulären Matrix, die maßgeblich an Remodeling- Prozessen beteiligt sind, wurden einer Analyse unterzogen. Insbesondere waren dafür die Genexpressionen der Kollagene Col1 und Col3, der für den Um- und Abbau der kollagenen Strukturen verantwortlichen Matrixmetalloproteinasen (MMP) sowie deren Inhibitoren (TIMP) zwei und neun Wochen nach Intervention interessant.

4.4.7 Geschlechterunterschiede in der Fibroseentwicklung

Kollagenstrukturen wurden mit Sirius Rot angefärbt (je zwei Gewebequerschnitte von je acht Tieren pro Gruppe), um den Gesamtkollagengehalt im Myokardgewebe beurteilen zu können (Abbildung 4.29, Abbildung 4.30). Die digitale Auswertung, wie unter 3.5.2 beschrieben, ergab den interstitiellen Kollagengehalt, den so genannten Fibrosescore. (Abbildung 4.28).

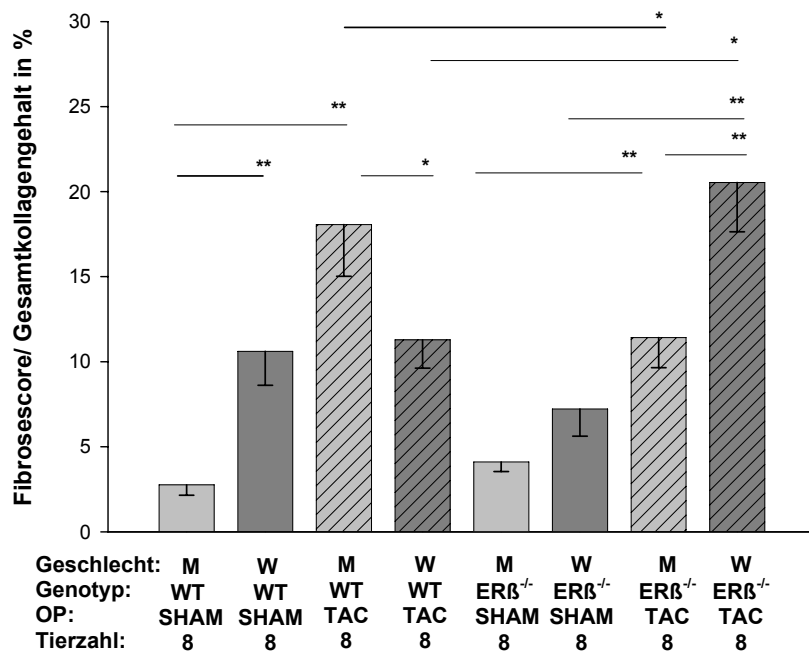


Abbildung 4.28: Grafische Darstellung des Gesamtkollagengehalts (Fibrosescore) neun Wochen nach TAC. M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ERβ^{-/-} = Östrogen Rezeptor β Knock- out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P- Wert mit 0,05 an.

Anhand des kalkulierten Fibrosescores und der histologischen Präparate war ersichtlich, dass ein Geschlechterunterschied im interstitiellen Kollagengehalt in den scheinoperierten

WT- Tieren existiert. Die weiblichen Tiere verfügten über einen signifikant höheren Kollagengehalt (10%) als die männliche Kontrollgruppe (3%). Durch die Induktion der TAC stieg der Kollagengehalt und somit das Ausmaß der Fibrose in den männlichen Tieren drastisch an (17%), wohingegen der Kollagengehalt in den weiblichen Tieren nahezu unverändert blieb (11%). Ein Geschlechterunterschied konnte somit auch nach TAC-Induktion in den WT- Tieren festgestellt werden.

In den scheinoperierten $ER\beta^{-/-}$ - Tieren konnte kein signifikanter Geschlechterunterschied im Kollagengehalt beobachtet werden. Die weiblichen Tiere wiesen dennoch einen höheren Anteil an kollagenen Strukturen (7%) als die männlichen Tiere (4%) auf. Bemerkenswerterweise war der Kollagengehalt der weiblichen scheinoperierten $ER\beta^{-/-}$ niedriger als der weiblichen WT- Tiere ($p \leq 0.03$ Mann- Whitney- U- Test). Nach TAC-Induktion konnte in beiden Geschlechtern ein signifikanter Anstieg an kollagenen Strukturen und somit eine Zunahme der Fibrose festgestellt werden. Die Zunahme war in den weiblichen Tieren im Vergleich zu den Männchen mit TAC signifikant höher (20% vs. 9%). Im Umkehrschluss entwickelten die männlichen Tiere mit $ER\beta$ - Deletion weniger Fibrose als die dazugehörige weibliche Kontrollgruppe.

Es konnten somit im basalen Zustand und neun Wochen nach TAC sowohl Geschlechterunterschiede als auch genotypabhängige Unterschiede in der Ausprägung der Fibrose festgestellt werden.

In Abbildung 4.29 und Abbildung 4.30 sind die Sirius- Rot Färbung an histologischen Schnitten in WT- und $ER\beta^{-/-}$ - Tieren zum Neun- Wochen- Zeitpunkt dargestellt. Diese zeigt exemplarisch die Kollagenfärbungen an je sechs Tieren pro Gruppe, unterschieden nach Geschlecht und Intervention.

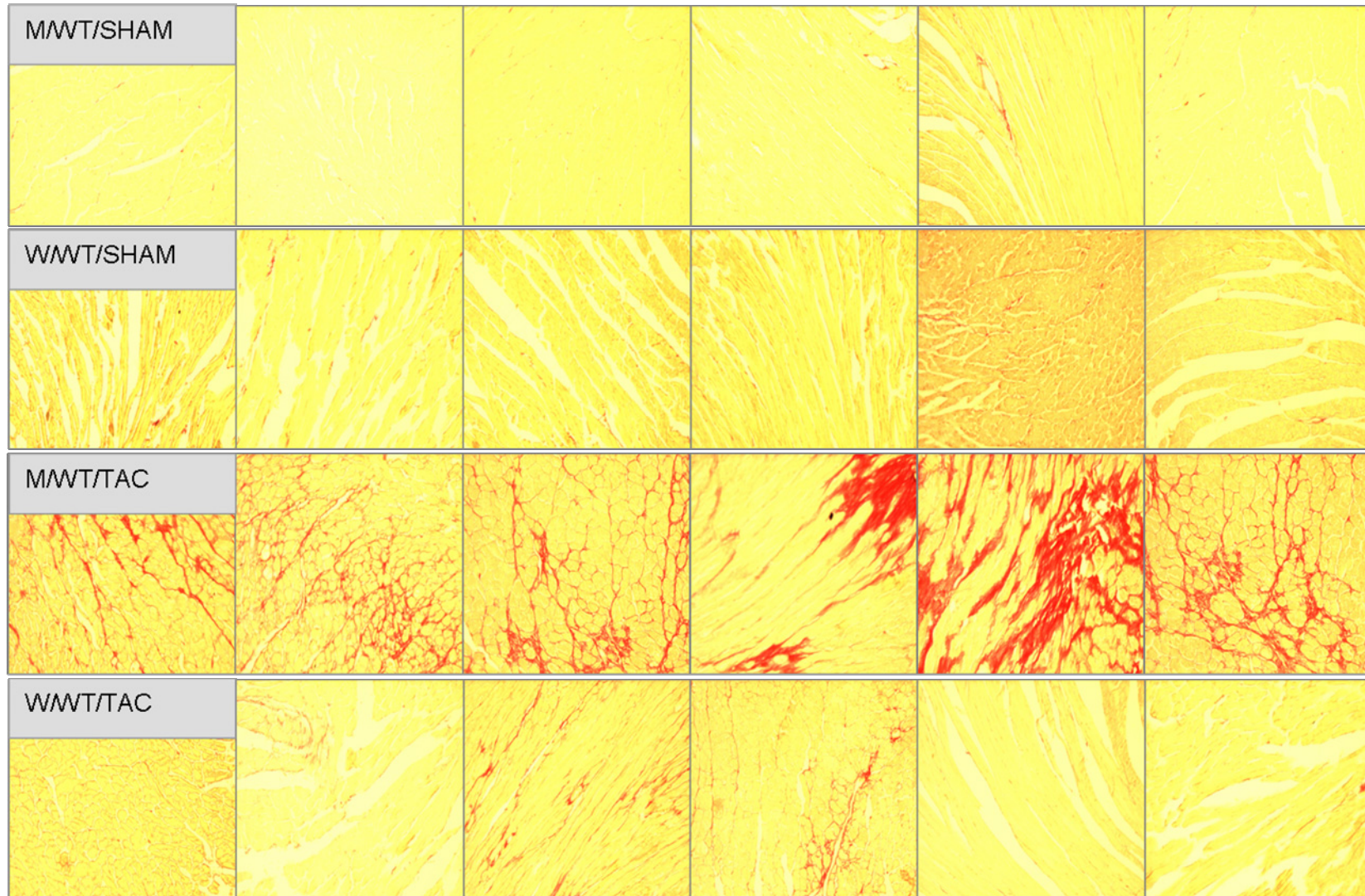


Abbildung 4.29: Sirius Rot Färbung an histologischen Schnitten in WT- Tieren nach neun Wochen

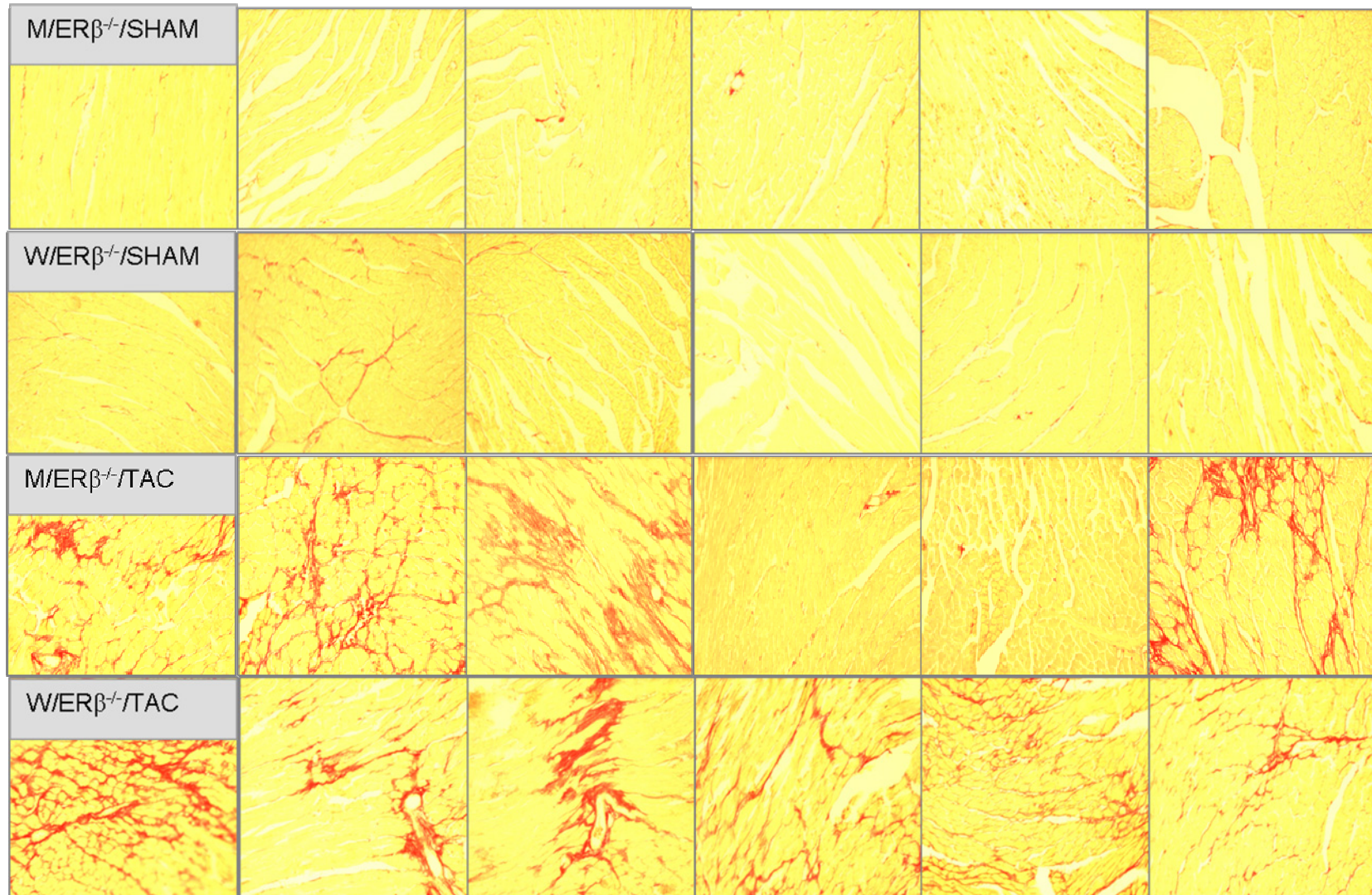


Abbildung 4.30: Sirius Rot Färbung an histologischen Schnitten in ER β^{+} - Tieren nach neun Wochen

4.4.8 Anstieg der Kollagenexpression bei Myokardhypertrophie

Nach zwei Wochen wies die relative Genexpression von Col1 und Col3 ein sehr ähnliches Muster auf. Ein Geschlechterunterschied in den Expressionen erreichte in den scheineroperierten WT- Tieren für Col1 ein Signifikanzniveau und konnte für Col3 tendenziell festgestellt werden. Die weiblichen Kontrolltiere wiesen eine höhere Expression als die männliche Kontrollgruppe auf. Durch die Induktion der TAC stieg die Expression der Kollagene in den männlichen Tieren erheblich an. In den weiblichen Tieren zeigten sich hingegen keine signifikanten Veränderungen.

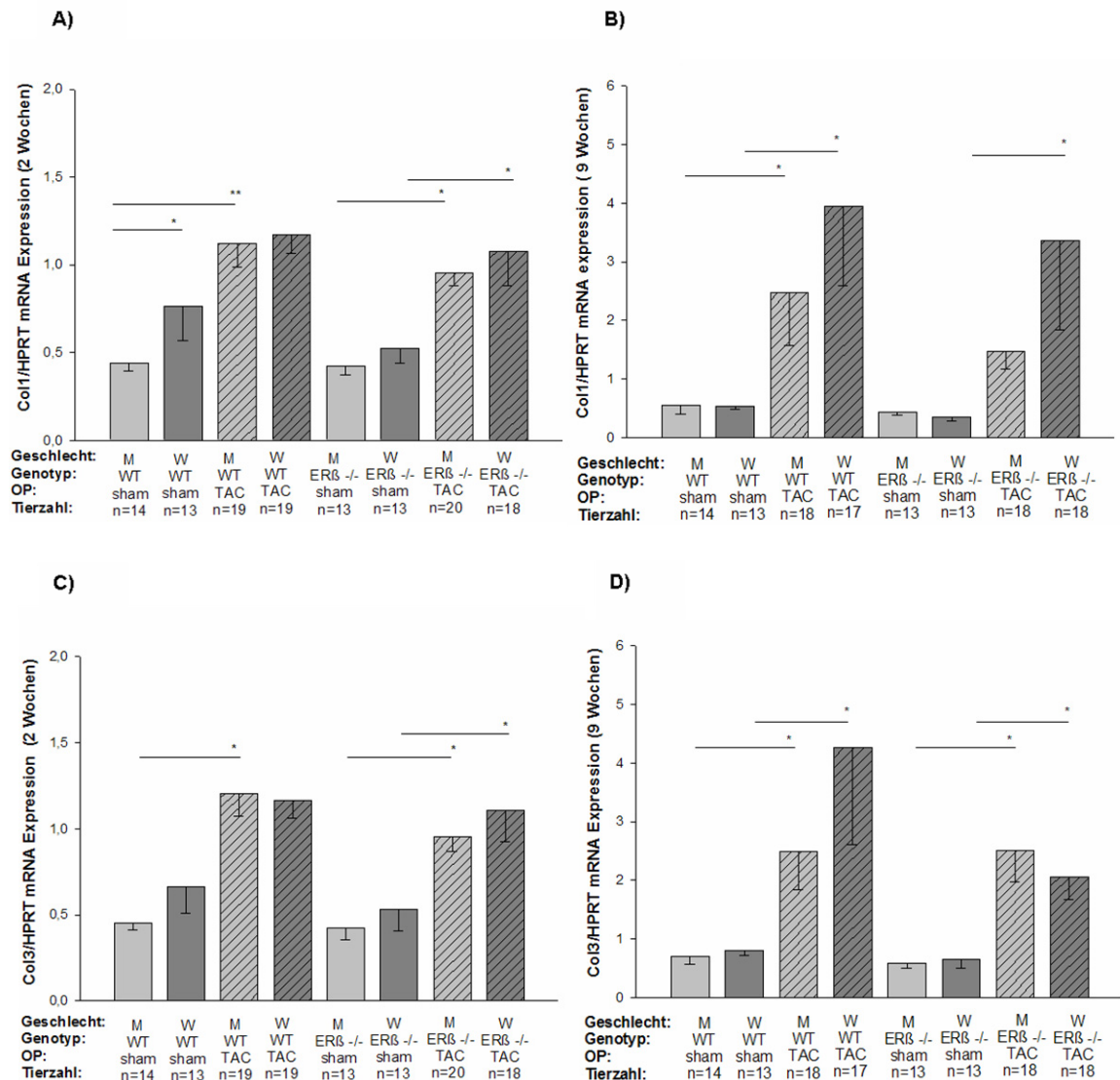


Abbildung 4.31: A) Genexpression von Col1 nach zwei Wochen; B) Genexpression von Col1 nach neun Wochen; C) Genexpression von Col3 nach zwei Wochen; D) Genexpression von Col3 nach neun Wochen im myokardialen Gewebe. M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ERβ^{-/-} = Östrogen Rezeptor β Knock- out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P- Wert mit 0,05 an; ** gibt den P- Wert mit 0,01 an.

Die späte Phase der Hypertrophie kennzeichnete ein starker Anstieg von Col1 und Col3. Signifikante Unterschiede in Geschlecht und Genotyp fehlten. Die relative Genexpression von Col1 und Col3 nahm nach neun Wochen im Vergleich zum Zwei- Wochen- Zeitpunkt stark zu.

4.4.9 Veränderte Genexpression der Matrixmetalloproteinasen

Die Metalloproteinasen, die für den Ab- und Umbau der Kollagene in der extrazellulären Matrix verantwortlich sind, zeigen zu beiden Zeitpunkten ein sehr unterschiedliches Expressionsmuster.

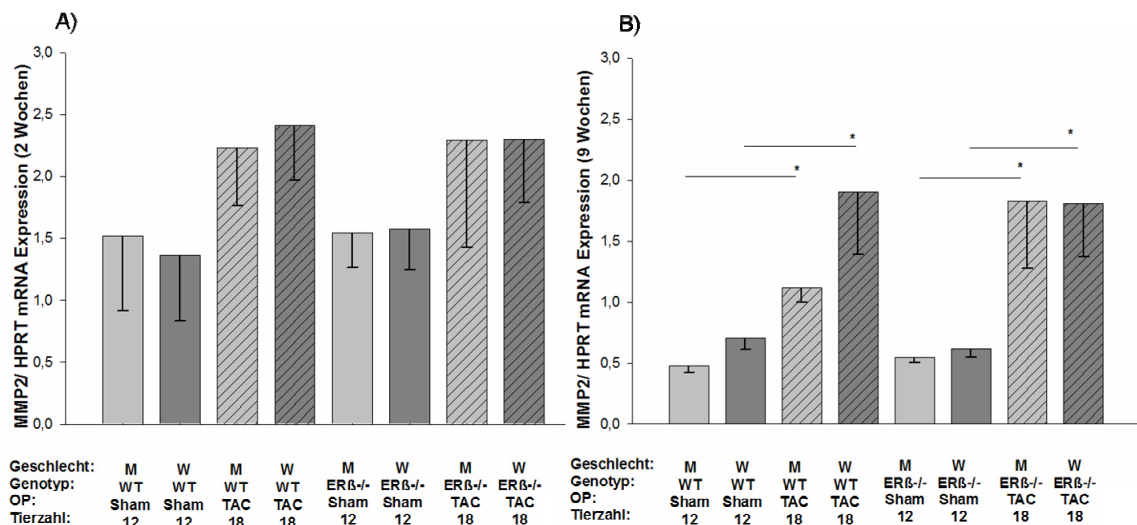


Abbildung 4.32: A) Genexpression von MMP2 im myokardialen Gewebe nach zwei Wochen; B) Genexpression von MMP2 im myokardialen Gewebe nach neun Wochen. M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ERβ^{-/-} = Östrogen Rezeptor β Knock- out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P- Wert mit 0,05 an.

Zwei Wochen nach Induktion der TAC konnte in beiden Genotypen eine erhöhte Genexpression von MMP2 beobachtet werden (Abbildung 4.32 A). Dieser Anstieg erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Zum Neun- Wochen- Zeitpunkt manifestierte sich diese Erhöhung als signifikante Veränderung (Abbildung 4.32 B). Zu keinem Zeitpunkt waren Unterschiede zwischen den Geschlechtern und Genotypen zu beobachten.

Die MMP9- Expression war zwei Wochen nach Induktion einer TAC durch starke interindividuelle Schwankungen gekennzeichnet. Die männlichen WT- Tiere mit TAC zeigten eine tendenziell erhöhte Expression gegenüber der Kontrollgruppe. In den anderen untersuchten Gruppen waren keine Veränderungen in der Genexpression zu beobachten (Abbildung 4.33).

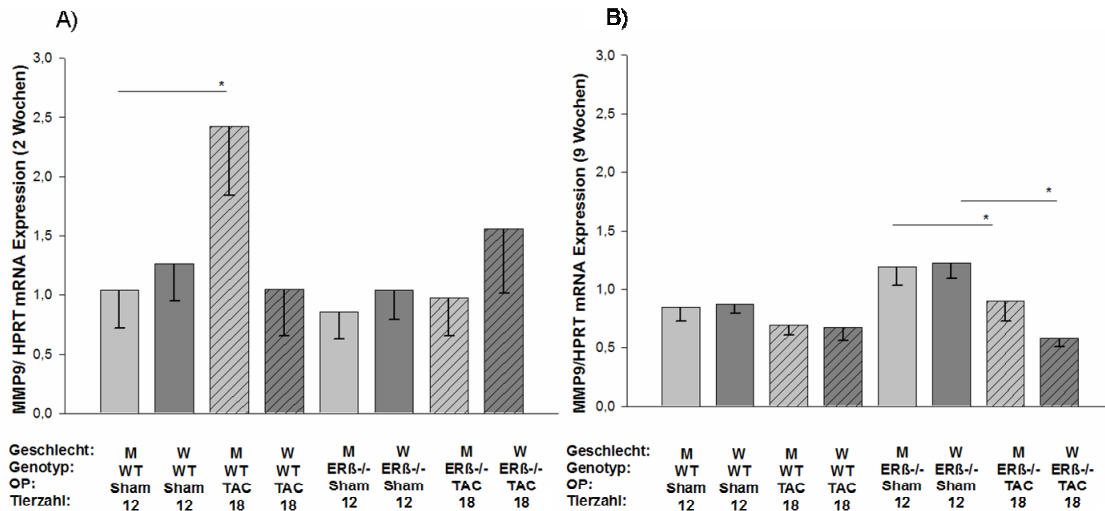


Abbildung 4.33: A) Genexpression von MMP9 im myokardialen Gewebe nach zwei Wochen; B) Genexpression von MMP9 im myokardialen Gewebe nach neun Wochen. M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ERβ^{-/-} = Östrogen Rezeptor β Knock- out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P- Wert mit 0,05 an.

Neun Wochen nach Intervention zeigte sich die Genexpression von MMP9 in den WT-Tieren aller Gruppen unverändert. Die Genexpression in den ERβ^{-/-}-Tiere war nach TAC-Induktion jedoch signifikant vermindert. Diese Reduktion zeigte sich unabhängig vom Geschlecht.

4.4.10 Gesteigerte Expression der Matrixmetalloproteinasen Inhibitoren

Die Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen, TIMP1 und TIMP2, interagieren mit einigen Mitgliedern der Metalloproteinasen. Es ist bekannt, dass TIMP2 mit MMP1, MMP2, MMP9 und vielen anderen interagieren, wohingegen TIMP1 vor allem MMP9 inhibiert. Bilden die TIMP mit den Metalloproteinasen Komplexe, so sind diese irreversibel inaktiviert[7].

Die Genexpressionen von TIMP1 und TIMP2 zeigten zu beiden untersuchten Zeitpunkten ein unterschiedliches Expressionsmuster. TIMP1 wurde nach zwei und neun Wochen nach TAC in beiden Geschlechtern und Genotypen signifikant stärker exprimiert (Abbildung 4.34 A/B), wobei der frühere Zeitpunkt ein höheres Expressionsniveau zeigte als der spätere.

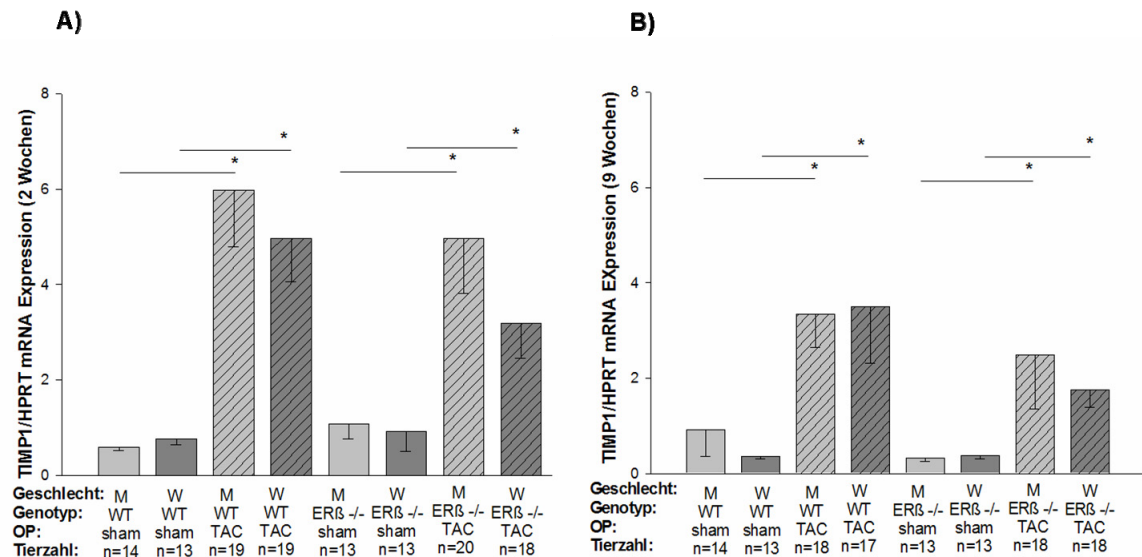


Abbildung 4.34: A) Darstellung der Genexpression von TIMP1 im myokardialen Gewebe nach zwei Wochen; B) Genexpression von TIMP1 im myokardialen Gewebe nach neun Wochen. M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ERβ^{-/-} = Östrogen Rezeptor β Knock- out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P- Wert mit 0,05 an.

Die TIMP2- Genexpression war nach zwei Wochen nur in der männlichen WT- Gruppe erhöht (Abbildung 4.35 A). In den anderen Gruppen zeigte sich keine veränderte Genexpression. Nach neun Wochen stieg die Expression von TIMP2 nach TAC in allen Gruppen mit Ausnahme der männlichen ERβ^{-/-}- Tiere signifikant an (Abbildung 4.35 B). Ein signifikanter Geschlechterunterschied wurde nicht beobachtet. Diese Effekte blieben ohne Einfluss des Genotyps.

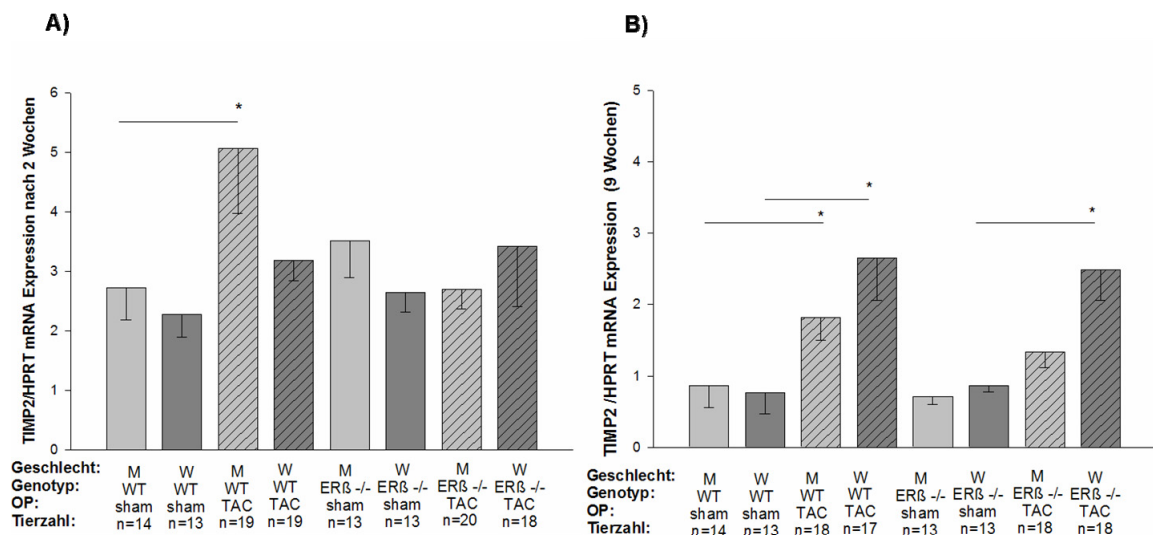


Abbildung 4.35: A) Darstellung der Genexpression von TIMP1 im myokardialen Gewebe nach zwei Wochen; B) Genexpression von TIMP1 im myokardialen Gewebe nach neun Wochen. M = Männchen; W = Weibchen; WT = Wildtyp; ERβ^{-/-} = Östrogen Rezeptor β Knock- out; SHAM = Scheinoperiert; TAC= Transversale Aortenkonstriktion; n= Anzahl der Tiere. * gibt den P- Wert mit 0,05 an.

Zusammenfassung zur Untersuchung des kardialen Remodeling bei Myokardhypertrophie und der Progression in die Herzinsuffizienz

Im basalen Zustand und neun Wochen nach TAC konnten sowohl Geschlechterunterschiede als auch genotypabhängige Unterschiede in der Fibroseentwicklung festgestellt werden. Scheinoperierte WT- Weibchen besaßen einen höheren Kollagengehalt als die männliche Vergleichsgruppe. Nach TAC- Induktion erhöhte sich der interstitielle Kollagengehalt nur in den männlichen WT- Tieren. Mit dem Verlust des ER β ging der Geschlechterunterschied in den scheinoperierten Tieren verloren, führte jedoch nach TAC- Induktion zu einem deutlichen Anstieg des interstitiellen Kollagengehalts in beiden Geschlechtern. Dabei entwickelten die weiblichen ER $\beta^{-/-}$ - TAC- Tiere eine stärkere Fibrose als die männliche Vergleichsgruppe.

In den Genexpressionen von Enzymen bzw. Komponenten der extrazellulären Matrix, die maßgeblich an Remodeling- Prozessen beteiligt sind, konnten deutliche Unterschiede zwischen der adaptiven und maladaptiven Phase der Hypertrophie beobachtet werden.

Die Kollagene Col1 und Col3 zeigten zwei Wochen nach TAC ein Expressionsmuster auf, das vergleichbar mit dem Fibrosescore ist. Nach neun Wochen nahm die relative Genexpression von Col1 und Col3 in den TAC- Gruppen im Vergleich zum Zwei- Wochen- Zeitpunkt stark zu. Unterschiede im Geschlecht und Genotyp blieben aus.

Die Genexpressionen von MMP2 und MMP9 blieben zum frühen Zeitpunkt unverändert, zum späten Zeitpunkt wurden dagegen gegenläufige Expressionen von MMP2 und MMP9 festgestellt: Nach TAC- Induktion stieg MMP2 in beiden Geschlechtern und Genotypen an, während MMP9 tendenziell in den WT- Tieren und signifikant in den ER $\beta^{-/-}$ - Tieren reduziert war. Ihre Inhibitoren TIMP1 und TIMP2 zeigten zu beiden Zeitpunkten verschiedene Expressionsdaten: TIMP1 war zu beiden Zeitpunkten signifikant in beiden Geschlechtern nach TAC angestiegen. Diese Effekte waren nicht vom Genotyp beeinflusst. TIMP2 dagegen war nach zwei Wochen nur in der männlichen WT- Gruppe erhöht und nach neun Wochen stieg die Expression von TIMP2 nach TAC in allen Gruppen mit Ausnahme der männlichen ER $\beta^{-/-}$ - Tiere signifikant an.

4.5 Geschlechtsspezifische Prozesse bei Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz: Apoptose

Im insuffizienten Herzen sind ein pathologisches Wachstum der Kardiomyozyten und gesteigerter Zellverlust durch programmierten Zelltod (Apoptose) biologische Antworten auf eine andauernde Drucklast [147,148,150,174]. Die Mikroarray- Analysen präsentierten apoptotische Prozesse und Signalkaskaden ausschließlich in männlichen ER $\beta^{-/-}$ - Tieren nach Hypertrophie- Induktion.

Die Daten aus dem Mikroarray wurden durch einen TUNEL- Assay verifiziert und visualisiert. Mit diesem Assay kann die Fragmentierung der DNA im Zellkern nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 3.5.4). Daher sollte überprüft werden, ob der programmierte Zelltod nur in den männlichen Tieren mit ER β - Deletion bei anhaltender Drucklast induziert wurde.

In der späten Phase der Hypertrophie konnte in allen untersuchten Gruppen ausschließlich in den männlichen ER $\beta^{-/-}$ - Tieren mit TAC gehäuft fragmentierte DNA in den Zellkernen nachgewiesen werden (Abbildung 4.36 a- c). In den anderen Gruppen zeigten sich hingegen nur vereinzelt oder keine apoptotischen Signale (Abbildung 4.36 d- f, Abbildung 4.37, Abbildung 4.38).

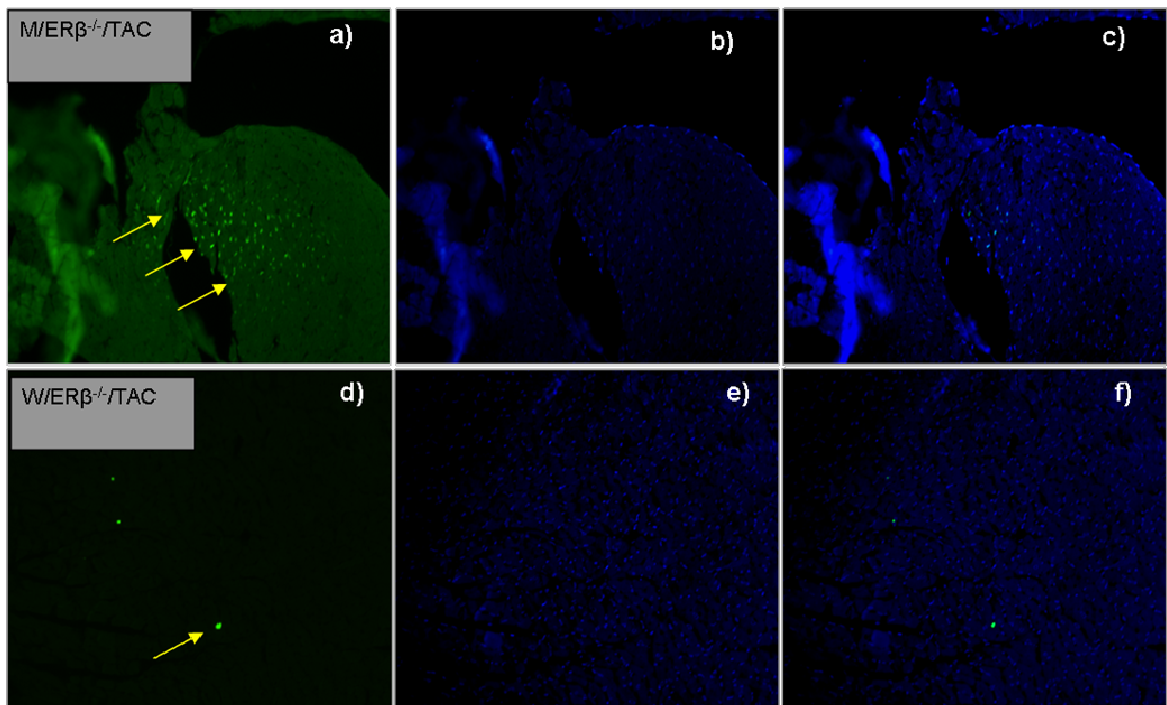


Abbildung 4.36: TUNEL-Assay an histologischen Schnitten nach neun Wochen. Darstellung repräsentativer Schnitte aus den $ER\beta^{-/-}$ - Tieren nach Hypertrophie-Induktion. a/d) Grün-TdT Enzym anti FITC; b/e) blau-Kernfärbung mit DAPI; c/f) Overlay.

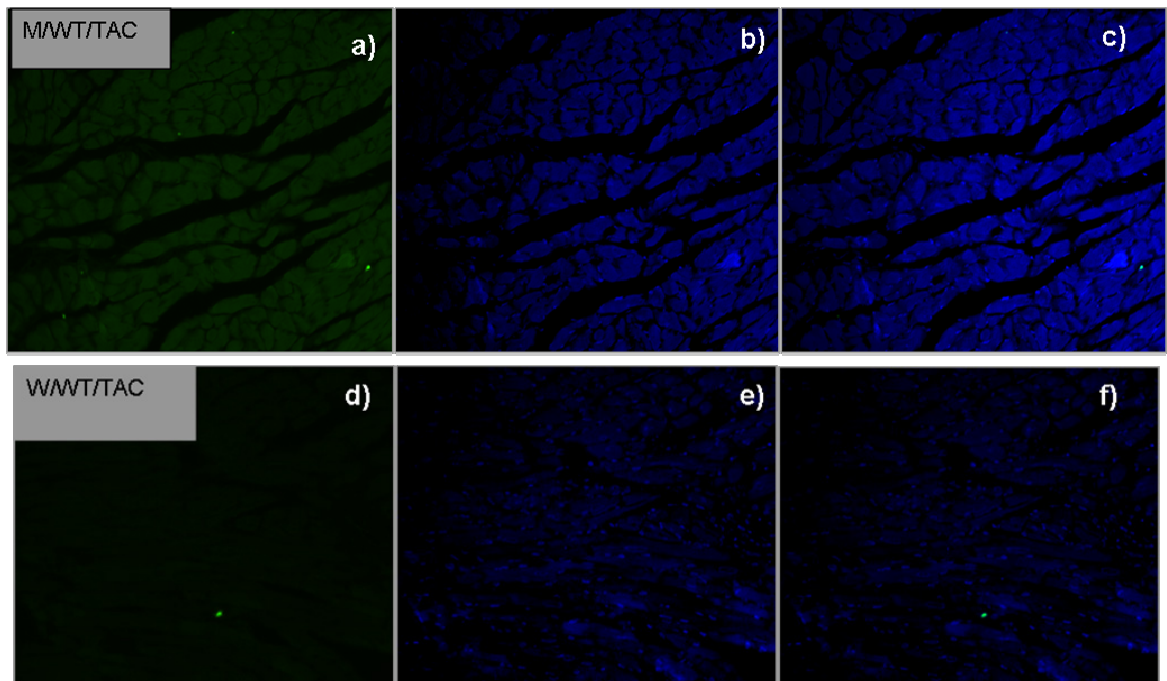


Abbildung 4.37: TUNEL-Assay an histologischen Schnitten nach neun Wochen. Darstellung repräsentativer Schnitte aus den WT- Tieren nach Hypertrophie-Induktion. a/d) Grün-TdT Enzym anti FITC; b/e) blau-Kernfärbung mit DAPI; c/f) Overlay.

Die scheinooperierten Tiere sowie die Negativkontrolle zeigten kein apoptotisches Signal, während in der Positivkontrolle eindeutig der programmierte Zelltod nachweisbar war.

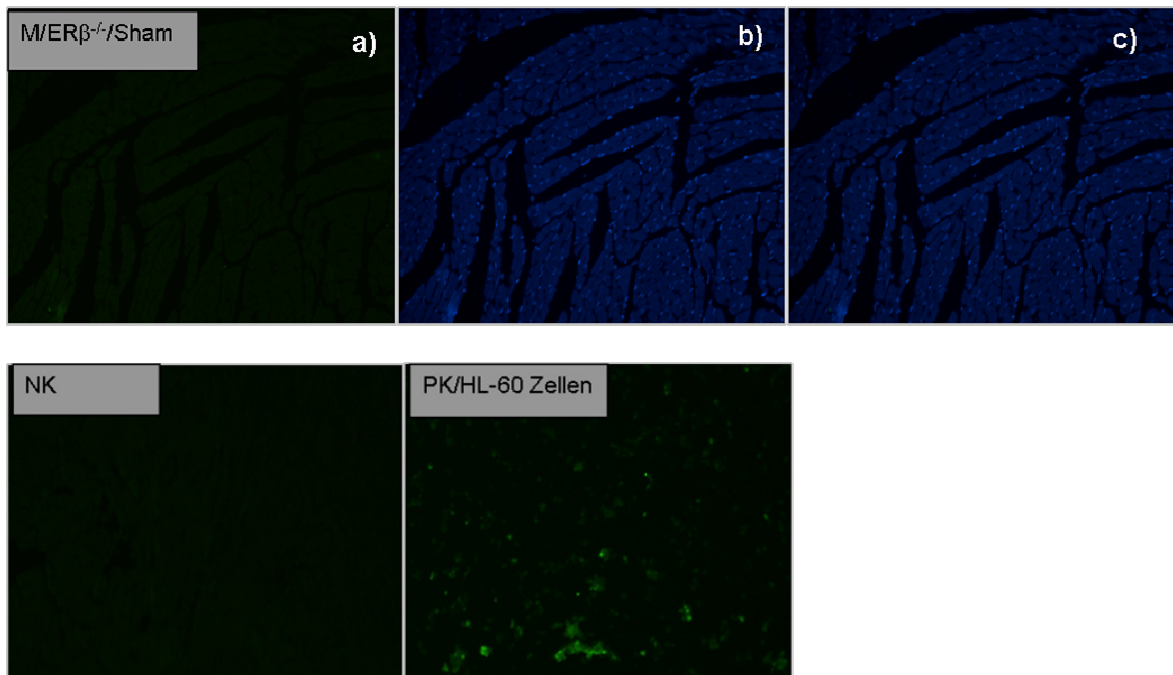


Abbildung 4.38: TUNEL-Assay an histologischen Schnitten nach neun Wochen. Darstellung eines repräsentativen Schnitts männlicher scheinooperierter $ER\beta^{-/-}$ Tiere. a) Grün-TdT Enzym anti FITC; b) blau- Kernfärbung mit DAPI; c) Overlay; NK= Negativkontrolle; PK= Positivkontrolle.

5. Diskussion

Eine Vielzahl experimenteller Studien untersuchte die Rolle von Östrogen nach myokardialen Infarkt (MI), in Myokardhypertrophie und linksventrikulärem Remodeling, da kardiovaskuläre Erkrankungen Frauen und Männer auf unterschiedliche Weise betreffen. Wie klinische Studien zeigten, sind die wesentlichen Geschlechterunterschiede das Erscheinungsalter der Krankheit, die Symptomatik und der Krankheitsverlauf. Die Gründe dafür sind noch weitgehend unklar; ein Einfluss der Geschlechtshormone und ihrer Rezeptoren erscheint wahrscheinlich. Das Interesse experimenteller Studien richtete sich vorrangig auf die potentielle kardioprotektive Wirkung des Östrogens [54, 57, 58].

Viele Befunde zeigten, dass eine Myokardhypertrophie durch Östrogen vermindert wird [54,57,58,175,176]. Dies deutet auf eine protektive Wirkung des Östrogens hin. Jedoch nur eine limitierte Anzahl von Studien konzentrierte sich bisher auf die genauen Rollenverteilungen der Östrogenrezeptoren ER α und ER β sowie geschlechtsspezifische Aspekte bei der Entstehung und Progression der Myokardhypertrophie. ER β scheint dabei eine schützende Funktion einzunehmen, dies wurde für ER α bislang nicht bestätigt[56][57] [58].

Die vorliegende Studie verfolgte das Ziel, Geschlechterunterschiede bei der Entwicklung der Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz und die damit verbundenen myokardialen Veränderungen sowie den Einfluss des Östrogenrezeptors β zu determinieren. Aus diesem Grund bildeten männliche und weibliche ER $\beta^{-/-}$ und WT- Mäuse die Basis der Analysen.

Es gibt zahlreiche Möglichkeiten, in der Maus *in vivo* eine pathologische linksventrikuläre Hypertrophie zu erzeugen, beispielsweise durch pharmakologische Manipulation, myokardialen Infarkt oder abdominale bzw. transversale Aortenkonstriktion. In dieser Arbeit wurde eine Myokardhypertrophie durch eine transversale Aortenkonstriktion (TAC) induziert. Diese Methodik ist ein anerkanntes und reproduzierbares Modell zur Induktion einer drucklast- induzierten Myokardhypertrophie [160,161]. Diese ist zumindest in einigen Gesichtspunkten der humanen Myokardhypertrophie nach Aortenstenose vergleichbar, auch bei dieser sind Geschlechterunterschiede beschrieben [15,16,17,18,19].

5.1 Geschlechterunterschiede in der Morphologie und Funktion bei Myokardhypertrophie und der Progression in die Herzinsuffizienz

Die frühe Phase der Myokardhypertrophie war durch eine morphologische Adaption des Myokards auf eine erhöhte Drucklast geprägt. Es entwickelte sich eine konzentrische oder adaptive Hypertrophie: Herzgewichte, linksventrikuläre Masse (LVM) sowie die Wanddicken der Herzen nahmen in beiden Geschlechtern signifikant zu (Abbildung 4.4).

Eine Dilatation des linken Ventrikels (Abbildung 4.8) war dabei nicht zu sehen. Charakteristisch für diese Hypertrophieform ist der Erhalt der Herzfunktion, was durch echokardiographische Untersuchungen der systolischen Funktion bestätigt werden konnte. Es wurden keine Geschlechterunterschiede nachgewiesen. Diese Befunde stimmen mit der Literatur überein [177].

5.1.1 Geschlechterunterschiede in der späten Phase der Myokardhypertrophie: Morphologie und Funktion

Bei anhaltender Drucklast entwickelt sich die konzentrische Hypertrophie zur maladaptiven Hypertrophie, die häufig mit Herzinsuffizienz einhergeht. Bedeutendes Merkmal einer Herzinsuffizienz ist eine Dilatation des linken Ventrikels, verbunden mit einer Störung der systolischen und diastolischen Funktion [2]. Diese tritt im vorliegenden Modell nach neun Wochen auf. Hier zeigen sich erstmals Geschlechterunterschiede in der Funktion.

Die späte Phase der Untersuchung zeigte die beschriebene Ausprägung der linksventrikulären konzentrischen Hypertrophie mit einem signifikanten Geschlechterunterschied in den WT- Tieren nach TAC. Hier wiesen die männlichen Tiere ein höheres Ausmaß der Myokardhypertrophie als die weiblichen Tiere auf. Diese Resultate stimmen zumindest partiell mit den Studien von Skavdahl et. al [60] überein, die eine geschlechtsabhängige Myokardhypertrophie mit Funktionsverlust in ihren Tieren zeigen konnten, die jedoch bei ähnlicher Behandlung bereits nach zwei Wochen auftrat. Nun stellt sich an dieser Stelle die Frage, wie sich das spätere Auftreten des Geschlechterunterschiedes in der Hypertrophieentwicklung in der vorliegenden Studie im Vergleich zur Studie von Skavdahl et. al erklären lässt [158]. Der Unterschied in der zeitlichen Ausprägung der Hypertrophie könnte auf die Methodik zurückzuführen sein: Skavdahl et al. verwendeten in ihrer Studie eine 27-Gauge-Nadel, während hier eine 26-Gauge-Nadel benutzt wurde. Demnach war die Konstriktion der Aorta bei Skavdahl et. al sehr viel stärker als in der vorliegenden Studie und führte damit zu einer früheren und stärkeren Myokardhypertrophie.

Die Charakterisierungen der systolischen und diastolischen Funktion durch Echokardiographie und Hämodynamik zeigten, dass sich die Tiere im Übergang von der kompensierten zur dekompenzierten Hypertrophie befanden. Dies wurde insbesondere für die $ER\beta^{-/-}$ -Männchen deutlich. Alle untersuchten TAC- Gruppen zeigten einen starken Abfall der EF, wobei das Absinken der EF in den männlichen $ER\beta^{-/-}$ - Tieren am stärksten ausgeprägt war. Die Parameter dp/dt_{max} und dp/dt_{min} waren in allen Versuchsgruppen nach TAC- Induktion deutlich erhöht. Das spricht für eine Erhöhung der Kontraktilität, die aufgrund der erhöhten Nachlast jedoch nicht für eine Verbesserung der EF ausreichte.

Des Weiteren war der linksventrikuläre enddiastolische Druck in den männlichen Tieren erhöht. Die stärkste diastolische Dysfunktion wiesen erneut die Männchen mit ER β -Deletion auf. Dies könnte Ausdruck der vermehrten Fibrose sein. Somit finden sich deutliche Hinweise auf eine systolische und diastolische Herzinsuffizienz nach neun Wochen in männlichen und weiblichen WT- und ER $\beta^{-/-}$ -Tieren, die am stärksten in den männlichen ER $\beta^{-/-}$ -Tieren ausgeprägt ist.

5.1.2 Östrogenrezeptor β moduliert die kardiale Antwort bei induzierter Drucklast geschlechtsspezifisch

In diesem Mausmodell konnte ein Einfluss des ER β auf die Hypertrophieentwicklung und auf die Funktion des Myokards in der späten Phase, zum Zeitpunkt von neun Wochen nach TAC, festgestellt werden.

Im Gegensatz zu den WT-Tieren zeigten die ER $\beta^{-/-}$ -Tiere keinen Geschlechterunterschied in der Hypertrophieentwicklung. Weibliche ER $\beta^{-/-}$ -Tiere mit TAC entwickelten jedoch eine stärkere Hypertrophie als WT-Tiere gleicher Behandlung und gleichen Geschlechts. Bei den männlichen Tieren mit TAC beider Genotypgruppen kehrte sich dieser Effekt um: Männliche ER $\beta^{-/-}$ -Tiere wiesen einen Trend zu geringerer Hypertrophieentwicklung als männliche WT-Tiere auf.

Diese Ergebnisse erscheinen zunächst widersprüchlich, unter Bezugnahme der relativen Wanddicken (Wanddicke in Bezug auf den Ventrikeldurchmesser - Th/r) jedoch plausibel. Neun Wochen nach TAC konnte beobachtet werden, dass weibliche ER $\beta^{-/-}$ -Tiere einen höheren Anstieg des Th/r-Quotienten aufwiesen als die weiblichen WT-Tiere. Dies bedeutet, dass eine weitere Zunahme der Wanddicke stattgefunden haben muss, diese Tiere wiesen eine fortgeschrittene konzentrische Hypertrophie auf. Im Gegensatz dazu war eine Abnahme des Quotienten in den männlichen ER $\beta^{-/-}$ -Tieren im Vergleich zu den männlichen WT-Tieren zu sehen. Diese Beobachtung lässt auf eine Abnahme der Wanddicke bzw. auf eine Vergrößerung des Lumens schließen. Das sind Merkmale für eine exzentrische Hypertrophie, das heißt Dilatation des linken Ventrikels. Demnach ist in den männlichen ER $\beta^{-/-}$ -Tieren bereits der Beginn einer Herzinsuffizienz zu erkennen.

Ähnliche Beobachtungen konnten Skavdahl et al. machen [60]. Sie zeigten in ihrer experimentellen Studie mit WT- und ER $\beta^{-/-}$ -Mäusen zwei Wochen nach Induktion einer Aortenstenose, dass die weiblichen ER $\beta^{-/-}$ -Mäuse eine signifikant stärkere konzentrische Hypertrophie entwickelten als weibliche Wildtyp-Tiere. Dies spricht dafür, dass ER β bei linksventrikulärer Hypertrophie einen protektiven Effekt bei weiblichen Mäusen vermittelt. Im Gegensatz dazu hatte der Verlust des ER β bei männlichen Mäusen mit TAC keinen Effekt auf die Hypertrophieentwicklung [60]. In der vorliegenden Arbeit führte der Verlust des ER β in männlichen Sham-Tieren zu einem systolischen Funktionsverlust und

verstärkte sich tendenziell bei kardialer Hypertrophie. Die Auswurfraction (EF) der männlichen $ER\beta^{-/-}$ TAC- Tiere war die niedrigste aller untersuchten Tiergruppen. Weibliche Sham- und TAC- Tiere konnten hingegen die systolische Herzfunktion besser erhalten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass männliche $ER\beta^{-/-}$ Tiere nach Induktion einer TAC eine schlechtere linksventrikuläre Funktion, verbunden mit einer signifikanten Dilatation des Ventrikels, als weibliche $ER\beta^{-/-}$ Tiere zeigten.

Diese Befunde deuten auf eine negative Entwicklung in der Ausprägung einer Myokardhypertrophie bei fehlendem $ER\beta$ in beiden Geschlechtern. Der Krankheitsverlauf von adaptiver zur maladaptiven Hypertrophie sowie die Progression zur beginnenden Herzinsuffizienz scheinen in $ER\beta^{-/-}$ Tieren schneller voranzugehen und der relative Schutz der weiblichen Tiere ist aufgehoben. Man könnte daraus schließen, dass $ER\beta$ einen protektiven Einfluss auf die Hypertrophieentwicklung in weiblichen sowie in männlichen Tieren ausübt und die Progression der Hypertrophie verlangsamt. Pelzer et al. demonstrierten an weiblichen $ER\beta^{-/-}$ Mäusen eine hohe Mortalität und ein erhöhtes Auftreten von Markern für Herzversagen nach myokardialen Infarkt (MI) [59]. Der Verlust von $ER\beta$ scheint sich bei MI ebenfalls nachteilig auszuwirken. Die Beobachtungen der vorliegenden Studie verbunden mit denen in der Studie von Pelzer et. al sprechen für die Hemmung einer chronischen Herzinsuffizienz durch $ER\beta$.

In einer Vielzahl von Studien wird die kardioprotektive Wirkung von $ER\beta$ belegt und Östrogen eine positiv modulierende Wirkung im hypertrophierten und infarzierten Herzen durch die Vermittlung über $ER\beta$ anerkannt [56,57,58,178]. Babiker et al. behandelten weibliche, ovariectomierte $ER\alpha^{-/-}$ und $ER\beta^{-/-}$ Mäuse vier Wochen nach Induktion einer Aortenstenose mit E2 und verzeichneten eine signifikante Reduktion der Myokardhypertrophie in den $ER\alpha^{-/-}$, nicht jedoch in den $ER\beta^{-/-}$ Tieren [56]. Die Autoren nehmen eine durch $ER\beta$ vermittelte Schutzfunktion von E2 im murinen Herzen an. In einer weiteren Studie von Babiker et al. wurde die Auswirkung einer Östrogenbehandlung auf die Infarktgröße und das kardiale Remodeling untersucht [57]. Zur Determinierung der potentiellen Rolle beider Östrogenrezeptoren wurden erneut $ER\alpha^{-/-}$ und $ER\beta^{-/-}$ Mäuse untersucht. Die Behandlung mit E2 verminderte die Infarktgröße in $ER\alpha^{-/-}$ und WT- Tieren gleichermaßen; in den $ER\beta^{-/-}$ Tieren hingegen vergrößerte sich das Infarktareal. Weiterhin erhöhte sich durch die Gabe von E2 die Mortalität in den $ER\alpha^{-/-}$, nicht jedoch in den $ER\beta^{-/-}$ Mäusen. Es wurde erneut postuliert, dass $ER\beta$ die modulierenden Effekte von E2 im infarzierten Herz vermittelt.

Basierend auf diesen Erkenntnissen konnte aus der vorliegenden Studie ein Modell zur geschlechtsspezifischen Hypertrophieentwicklung entwickelt werden (Abbildung 5.1).

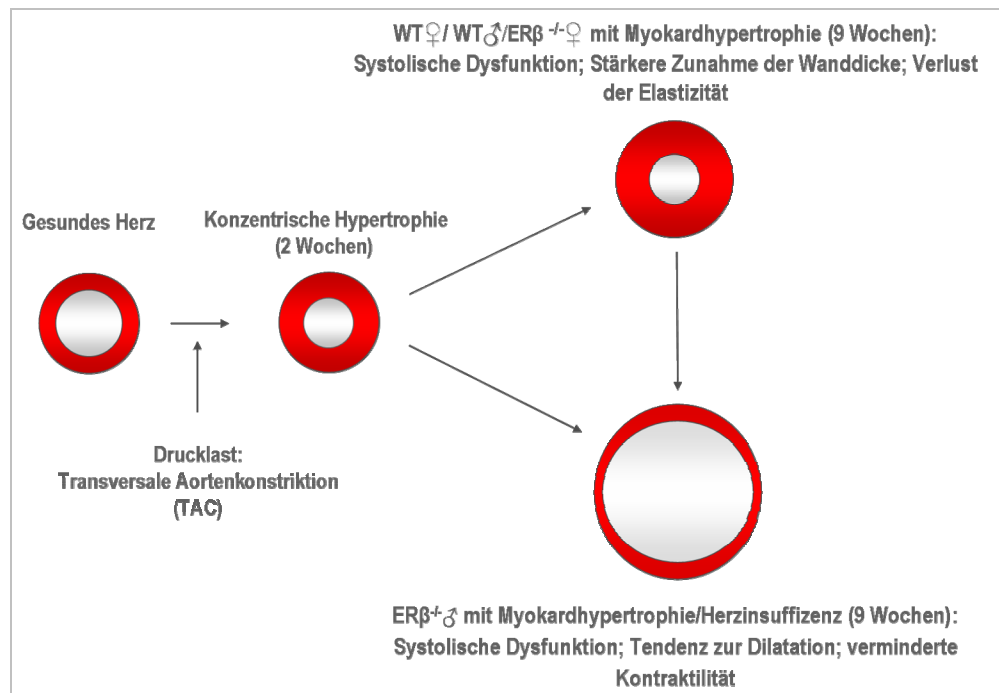


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung eigener Hypothesen zur geschlechtsspezifischen Hypertrophieentwicklung im Mausmodell. Bei Druckbelastung, durch Induktion einer transversalen Aortenkonstriktion (TAC), wird eine Zunahme der Wanddicke in beiden Geschlechtern nach zwei Wochen beobachtet: konzentrische Hypertrophie. Nach Neun Wochen sind Geschlechterunterschiede und der Einfluss von Östrogenrezeptor β in der Ausprägung der Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz festzustellen.

In diesem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ER β einen kardioprotektiven Einfluss auf die Adaption des männlichen Herzens hat und bestätigt die in der Literatur zugeschriebene schützende Rolle von ER β für das weibliche Herz.

5.2 Geschlechterunterschiede in der globalen Genexpression

Neun Wochen postoperativ wurde ein spezifisches Genexpressionsprofil für die untersuchten Tiergruppen identifiziert (vgl. Kapitel 4.3).

Die Anwendung des Mikroarray- Verfahrens zeigte deutlich die wichtige Rolle des Östrogenreptors β in der Entwicklung der Myokardhypertrophie. Die bisherige Auswertung der gewonnenen Daten demonstriert, dass das globale Genexpressionsprofil bei Myokardhypertrophie zwischen den Geschlechtern und den Genotypen unterschiedlich ist. In allen untersuchten Tiergruppen mit einer kardialen Hypertrophie konnten zum Neun-Wochen-Zeitpunkt jeweils spezifische Expressionsmuster festgestellt werden. In jeder der einzelnen TAC- Gruppen wurden stets bestimmte Gene spezifisch reguliert, die eindeutig biologischen Prozessen und Signalwegen zugeordnet werden konnten. Diese biologischen Prozesse waren, abhängig von Geschlecht und Genotyp, unterschiedlich.

In den weiblichen WT- Tieren nach Induktion einer Aortenstenose waren hauptsächlich Gene relativ stärker exprimiert, die in verschiedenen metabolischen Prozessen eine Rolle spielen. Dazu gehörten beispielsweise Proteinmetabolismus, Regulation des Zellmetabolismus und der kardiale Stoffwechsel. Die zellulären Komponenten zeigten die Kategorien des intrazellulären Bereiches, vor allem aber das Mitochondrium und die innere und äußere Mitochondrienmembran die stärkste Anreicherung an Genen. Die Gene, die signifikant in diesen zellulären Komponenten reguliert waren, sind überrepräsentativ im KEGG- Signalweg der oxidativen Phosphorylierung vertreten (Abbildung 4.20). Das globale Genexpressionsmuster für die weiblichen WT- Tiere lag vornehmlich im kardialen Stoffwechsel, in dessen zentralen Wegen die Genexpression zwar vermindert war, die Reduktion der Expression jedoch nicht so stark ausfiel wie in männlichen Tieren.

Dahingegen wiesen die männlichen WT- Tiere nach TAC ein anderes spezifisches Genexpressionsmuster auf. Hier wurden hauptsächlich Gene relativ stärker exprimiert, die am Remodeling der extrazellulären Matrix und der Proliferation beteiligt sind, sowie ribosomale Gene. Die Gene, die signifikant in zellulären Komponenten, wie dem Nukleus und Zytoskelett reguliert waren, ließen sich in den KEGG- Signalwegen der MAPK und Adhäsionsverbindungen zuordnen (Tabelle 4.3).

Weibliche Herzen kompensieren die Drucklast anscheinend durch eine bessere Adaption des kardialen Stoffwechsels. Dem steht die Induktion des kardialen Remodeling und der ribosomalen Proteinsynthese in den männlichen Herzen gegenüber. Die Beobachtungen der vorliegenden Studie korrespondieren mit anderen publizierten Daten, die ebenfalls die Effekte einer drucklast- induzierten Hypertrophie auf die Genexpression untersuchten [179,180,181]. In diesen Studien konnte in männlichen Tieren eine erhöhte Aktivierung von Remodeling- Prozessen, begleitet von der erhöhten Expression hypertrophieassoziiierter Genen, wie ANP, CTGF, sowie den Kollagenen demonstriert werden [180]. Die Herzen weiblicher Tiere waren durch einen besseren Erhalt der metabolischen Kapazität bei myokardialer Hypertrophie charakterisiert. Erst kürzlich konnten Haddad et al. an humanen Myokardproben, die eine idiopathische dilatative Kardiomyopathie aufwiesen, Geschlechterunterschiede im Genexpressionsprofil nachweisen: Bei Frauen waren Gene des Lipidstoffwechsels reduziert und Gene des Glukosestoffwechsel erhöht, während bei Männern Remodeling- assoziierte Gene induziert waren [182].

Die Daten der vorliegenden Mikroarray-Analyse zeigten biologische Prozesse auf, die die beobachteten Geschlechterunterschiede in der Hypertrophieentwicklung in der untersuchten späten Phase in WT- Tieren erklären könnten. Diese Befunde konnten in einer ähnlichen experimentellen Studie von Witt und Schubert et al. bestätigt werden

[177]. Ihre Beobachtungen konzentrierten sich auf einen frühen Zeitpunkt der Hypertrophie (zwei Wochen). Zu diesem Zeitpunkt war morphologisch kein Geschlechterunterschied in den untersuchten WT- Mäusen zu beobachten. Die Anwendung von Mikroarray- Analysen demonstrierte jedoch bereits ein ähnliches globales Genexpressionsmuster wie in der vorliegenden Studie: In weiblichen Herzen wurden Gene (PGC1 α - und PDK4) des Metabolismus weniger stark reprimiert als in den männlichen Tieren; männliche Herzen zeigten eine relativ höhere Expression von Genen, die der extrazellulären Matrix zugeordnet werden. Beide Studien zeigen, dass die kardiale Antwort auf eine erhöhte Drucklast mit einer langen geschlechtsabhängigen Adaptionsphase einhergeht.

5.3 Einfluss des Östrogenrezeptors β auf die globale Genexpression

Nach der Analyse der weiblichen und männlichen Tiere mit ER β - Deletion nach Induktion einer TAC konnte ein signifikanter Einfluss des ER β auf die globale Genexpression sowie eine geschlechtsabhängige Induktion diverser Gene und biologischer Prozesse beobachtet werden.

In den weiblichen Tieren mit ER β - Deletion konnte eine relativ höhere Expression von Genen, die an kardialen Umbauprozessen beteiligt sind, beobachtet werden (Tabelle 4.4). Dazu gehörten unter anderem die Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren sowie Gene des WNT- Signalweges. Ferner wurden auch ribosomale Gene, die der Proteinbiosynthese zugeordnet werden, relativ stärker exprimiert. Die stärkere Expression dieser Gene weist auf erhöhte Anforderungen an die Proteinbiosynthese im Zuge der Umbauprozesse in der extrazellulären Matrix hin. Damit zeigten weibliche ER $\beta^{-/-}$ - Tiere ein den männlichen WT- Tieren vergleichbares spezifisches Genexpressionsmuster nach TAC.

Für die männlichen Tiere war der Verlust des Östrogenrezeptors β ebenfalls gravierend. In den männlichen ER $\beta^{-/-}$ - Tieren konnte eine relativ höhere Expression einiger Gene nachgewiesen werden, die auf verstärkte Remodeling- Prozesse hindeuten. Jedoch wurde spezifisch die relativ höhere Expression von Genen beobachtet, die in apoptotische Signalwegen involviert sind. Dazu gehörte beispielsweise die Aktivierung verschiedener proteolytischer Kaspasen und die Induktion vom Apoptose induzierenden Protein – AIP (Tabelle 4.5).

Der Verlust von ER β führte demnach zu erheblichen geschlechts- und genotypabhängigen Veränderungen im Genexpressionsprofil und den damit verbundenen Signalwegen und deutet darauf hin, dass diese Änderungen zu nachteiligen biologischen Prozessen in der Entwicklung der Myokardhypertrophie führten.

5.4 Geschlechterunterschiede im kardialen Stoffwechsel bei Myokardhypertrophie

Viele experimentelle und klinische Studien weisen auf Veränderungen im Myokardstoffwechsel bei Hypertrophie und Herzinsuffizienz hin [4, 66, 68]. Dabei wurde ein Substratwechsel von der Fettsäureoxidation zum Glukosestoffwechsel beobachtet. Diese metabolische Substratverlagerung in Abhängigkeit von drucklast- induzierter Hypertrophie sowie der geringen Sauerstoffverfügbarkeit wird als adaptiver Mechanismus interpretiert. Die Reaktivierung des fetalen metabolischen Genprogramms bei Myokardhypertrophie wird als programmierte Stressantwort betrachtet [67][183]. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen des Substratswechsels sind noch unbekannt. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die PPAR eine entscheidende Rolle im metabolischen Remodeling übernehmen, in dem sie unter anderem die Balance zwischen Glukoseoxidation und Fettsäureoxidation regulieren. Geschlechterunterschiede im kardialen Metabolismus bei oxidativen Stress sind beschrieben worden, jedoch sind die regulatorischen Mechanismen dafür noch weitgehend unklar [110,184,185].

Die vorliegenden Mikroarray Analysen weisen auf Veränderungen im Myokardstoffwechsel hin. Damit stimmen diese mit zahlreichen Vorbefunden überein, die einen Substratwechsel von der Fettsäureoxidation zum Glukosestoffwechsel bei Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz zeigen [66][67,104,186].

Neun Wochen nach TAC-Induktion, also bei anhaltender Drucklast, waren die Proteinexpressionen aller PPAR- Isoformen und des Ko- Aktivators PGC-1 α signifikant vermindert. Weiterhin waren die Expressionen der an der Fettsäureoxidation beteiligten Enzyme, wie CD36, CPT1, ACOX und MCAD nach TAC ebenfalls reduziert (Kapitel 4.4). Es konnten jedoch keine Geschlechterunterschiede in der Expression der an der Fettsäureoxidation beteiligten Enzyme bei kardialer Hypertrophie festgestellt werden. Diese Beobachtungen stimmen mit einer Vielzahl von experimentellen Untersuchungen überein. Diese demonstrierten, dass einhergehend mit einer Reduktion oder eines Knock-Out der PPAR- Isoformen und PGC-1 α , eine Limitierung des Fettstoffwechsels vorliegt, begleitet von einer Lipidakkumulation sowie der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie und Herzinsuffizienz [4,66,68,71,87,89,94,96,104,187,188].

Viele Arbeiten zeigten weiterhin, dass hypertrophierte und insuffiziente Herzen einen Substratwechsel in Richtung Glukosestoffwechsel präferieren [104,186,189]. In der vorliegenden Studie blieb die Expression des Glukosetransporters GLUT4 neun Wochen nach TAC in allen untersuchten Gruppen unverändert (Abbildung 4.27 B). Die Expression des Glukosetransporters GLUT1 blieb nur in den weiblichen WT- Tieren nach TAC erhalten und wies eine signifikante Reduktion in allen anderen TAC- Gruppen auf (Abbildung 4.27 A). Damit ist die Expression des Glukose-Transporters GLUT1 nach TAC

geschlechtsspezifisch. Diese Resultate zeigen, dass der Fettstoffwechsel bei andauernder Drucklast gestört ist, die Energieversorgung des Herzens über GLUT4 aufrechterhalten wird und GLUT1 in den weiblichen WT- Tieren nach TAC eine weitere Energiequelle bereitstellt. Diese Ergebnisse werden nur teilweise von der aktuellen Literatur bestätigt. Bei kardialer Hypertrophie ist beschrieben worden, dass die GLUT1- Expression ansteigt, während die GLUT4- Expression reduziert ist. Diese Reduktion scheint mit dem Insulin-unabhängigen Anstieg der Glukoseaufnahme verbunden zu sein, die während einer kardialen Hypertrophie zu beobachten ist [183,190]. Bei Herzinsuffizienz hingegen konnten Razeghi et al. einen Abfall der GLUT1- Expression beobachten [191]. Sie vermuten, dass bei der Transition von einer kompensierten zu einer dekompenzierten Hypertrophie ein hoher Verlust der ATP- bildenden Leistung durch die Glukoseoxidation stattfindet. Bei Herzinsuffizienz kommt es zu einer vermehrten peripheren Lipolyse. Die zirkulierenden freien Fettsäuren werden zwar aufgenommen aber nicht metabolisiert. Dadurch werden Lipide in den Kardiomyozyten stark angereichert und es kommt zur so genannten Lipotoxizität [192,193,194,195]. Dies könnte ein Mechanismus sein, der die Hemmung der Glukoseoxidation in den Kardiomyozyten erklärt

Eine Reduktion in der GLUT1- Expression konnte außer in den weiblichen WT- Tieren nach TAC in allen anderen TAC- behandelten Tieren festgestellt werden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Mikroarray- Analysen. Hier konnte gezeigt werden, dass während einer kardialen Hypertrophie in den weiblichen WT- Tieren nach neun Wochen das metabolische Genprogramm vorherrscht. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass die mitochondriale Kapazität und damit die Phosphorylierungskapazität weniger stark reduziert waren als in der männlichen Vergleichsgruppe. Da eine geschlechtsspezifische Expression von GLUT1 in dieser Studie beobachtet wurde, liegt die Vermutung nahe, dass dieser Geschlechterunterschied im kardialen Metabolismus möglicherweise über diesen Glukose- Transporter vermittelt wird. Es konnten hingegen keine geschlechtsspezifischen Expressionen der an der Fettsäureoxidation beteiligten Enzyme bei Hypertrophie beobachtet werden. Darüber hinaus untermauern diese Befunde die Geschlechterunterschiede in der Hypertrophieentwicklung: Die weiblichen WT- Tiere zeigten das geringste Ausmaß an Hypertrophie im Vergleich zu allen anderen untersuchten TAC-Gruppen.

In der frühen Phase der Hypertrophie zeigten die PPAR- Isoformen unterschiedliche Expressionsmuster. PPAR α zeigte eine verminderte Expression nach TAC- Induktion in den männlichen WT- Tieren, wohingegen die Expression in den weiblichen Tieren unverändert blieb (Abbildung 4.21 A). Dieser beobachtete Geschlechterunterschied ging in den ER $\beta^{-/-}$ Tieren nach TAC- Induktion verloren. Eine signifikante Reduktion von

PPAR α konnte in beiden Geschlechtern verzeichnet werden. PPAR β/δ wies eine reduzierte Expression in den weiblichen WT- Tieren nach TAC auf, während die Reduktion bei Verlust von ER β nur in den männlichen TAC- Tieren nachgewiesen werden konnte (Abbildung 4.22 B). Die relativen Proteinexpressionen von PPAR γ und PGC-1 α wiesen zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Veränderungen auf (Abbildung 4.23/Abbildung 4.24 A).

Die beobachtete Heterogenität in den Proteinexpressionen der PPAR in der frühen Phase der Hypertrophie könnte auf verschiedene Funktionen der PPAR- Isoformen im kardialen System hinweisen. So wurde beschrieben, dass alle Isoformen neben dem kardialen Metabolismus auch Prozesse in Signalwegen der Inflammation beeinflussen [73,196,197,198,199]. PPAR α und PPAR β/δ wird aufgrund ihres hohen Vorkommens im Myokard eine entscheidende Rolle im kardialen Stoffwechsel zugeschrieben, hingegen liegt die Expressionsrate von PPAR γ weit unter der von PPAR α und PPAR β/δ . PPAR γ wird eine wichtige Rolle in inflammatorischen und fibrotischen Prozessen zuerkannt [91,197,200].

Besonderes Augenmerk soll an dieser Stelle auf die PPAR α - Expression nach zwei Wochen gerichtet werden. Der beobachtete Geschlechterunterschied in der Proteinexpression zu diesem frühen Zeitpunkt könnte einen Einfluss auf den Glukosetransporter GLUT1 besitzen, denn dieser wies ein der PPAR α - Expression vergleichbares Expressionsmuster auf. Die beobachteten Geschlechterunterschiede gingen für beide Expressionen in den ER $\beta^{-/-}$ Tieren verloren. In zwei Studien wurde postuliert, dass Geschlechterunterschiede über PPAR α vermittelt werden könnten [110,201]. Denkbar wäre ein möglicher Einfluss des Östrogenrezeptors β auf die PPAR α - Regulation im mitochondrialen Stoffwechsel. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Östrogenrezeptoren in Mitochondrien lokalisiert sind und diese einen Einfluss auf die mitochondriale Kapazität besitzen [115,116,202]. Des Weiteren führte eine Stimulation von MCF7-Zellen mit Östrogen zu einer erhöhten Aktivität der Östrogenrezeptoren, einhergehend mit gesteigerter oxidativer Phosphorylierung [115]. Die Untersuchung dieser möglichen Interaktion, die zur weiteren Aufklärung von Geschlechterunterschieden im kardialen Stoffwechsel beitragen könnte, bedarf weiterer Analysen.

5.5 Geschlechterunterschiede in der Fibroseentwicklung

Die Entwicklung der linksventrikulären Myokardhypertrophie ist ein angepasster Prozess, der eine induzierte Drucklast kompensiert [203,204]. Die strukturelle und funktionelle Manifestation des linksventrikulären Remodeling bei Myokardhypertrophie ist mit einer Vergrößerung der Kardiomyozyten und signifikanten Veränderungen in der Komposition der extrazellulären Matrix assoziiert. Diese Prozesse sind unter anderem für die

Veränderungen in der systolischen und diastolischen Herzfunktion verantwortlich [203,205]. Myokardiales Remodeling im Alter bzw. als Reaktion auf mechanische Belastung unterscheidet sich in weiblichen und männlichen Herzen [137,138]. Die molekularen Mechanismen und der Einfluss der Östrogenrezeptoren auf diese Prozesse sind bislang jedoch noch unklar.

In der vorliegenden Studie konnte demonstriert werden, dass Geschlechterunterschiede in den kardialen Umbauprozessen, wie sie in der Literatur beschrieben sind, existieren. Darüber hinaus konnte ein Einfluss des Östrogenrezeptors β auf das kardiale Remodeling und die Fibroseentwicklung beobachtet werden (Abbildung 4.28).

Die Bestimmung des Kollagengehalts (Fibrosescore) erbrachte, dass scheinooperierte weibliche WT- und ER $\beta^{-/-}$ - Tiere einen höheren Kollagengehalt aufwiesen als die männlichen Vergleichsgruppen. Die TAC- Induktion in den WT- Tieren führte zu einem dramatischen Anstieg des Kollagengehalts und damit zur stärkeren Fibrosierung ausschließlich in den männlichen Tieren, wohingegen der Kollagengehalt in den weiblichen Tieren unverändert blieb. Dieser Befund geht konform mit dem beobachteten Geschlechterunterschied in der Zunahme der linksventrikulären Masse, in der die Männchen eine stärkere Hypertrophieentwicklung aufwiesen als die weiblichen Tiere (Abbildung 4.4). Aktuelle Befunde aus dem eigenen Labor in einem MI-Mausmodell des gleichen Mausstammes verifizieren die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hinsichtlich des Geschlechterunterschiedes im Fibrosescore in scheinooperierten Tieren (Ehrenberg, Cantow, unpubliziert) [206].

Der Verlust von ER β führte zu einer vermehrten Fibrosierung des Myokards in beiden Geschlechtern nach TAC- Induktion. Das Ausmaß der Fibrosierung war jedoch in den weiblichen Tieren im Vergleich zur männlichen Vergleichsgruppe um ca. 10% deutlich erhöht (Abbildung 4.4). Dieser Befund unterstützt die Ausprägung der linksventrikulären Hypertrophie in den ER $\beta^{-/-}$ - Tieren: Die weiblichen ER $\beta^{-/-}$ - Mäuse entwickelten ein höheres Maß an Hypertrophie nach TAC als die weiblichen WT- Tiere. Im Gegensatz dazu kehrte sich dieser Effekt in den männlichen TAC- Tieren um. Eine mögliche Erklärung dafür liefert die nachgewiesene Erhöhung apoptotischer Prozesse in den männlichen ER $\beta^{-/-}$ - TAC- Tieren (vgl. Kapitel 4.3). Einhergehend mit dem Zellverlust sinkt die interstitielle Fibrose. Zusätzlich werden diese Befunde durch den systolischen und diastolischen Funktionsverlust sowie einer Dilatation des linken Ventrikels, die mit einer beginnenden Herzinsuffizienz assoziiert werden können, in dieser Versuchsgruppe gefestigt.

Dem Verlust von ER β folgen nachteilige Effekte auf die Entwicklung der kardialen Fibrose. *In- vivo*- Analysen belegen, dass antihypertrophe Effekte von Östrogen (E2) über ER β vermittelt werden. Pedram et al. demonstrierten die Verminderung der Angiotensin-II-induzierten Myokardhypertrophie durch eine ER β - vermittelte Signalkaskade [58]. Als

zweite Beobachtung verzeichneten die Autoren eine Reduktion der kardialen Fibrosebildung durch Behandlung mit E2 und führten diese Inhibierung auf die Wirkungsweise des ER β zurück. Andere experimentelle Studien weisen ebenfalls auf eine positive Wirkung von Östrogen auf die Hypertrophieentwicklung hin [54]. Bei drucklast-induzierter Myokardhypertrophie konnte durch eine Behandlung mit E2 die Hypertrophieentwicklung vermindert werden. Dagegen führte eine Behandlung mit E2 im MI- Modell zu einer weiteren Progression der Hypertrophie [53,55].

Es stellt sich die Frage, welche Mechanismen zu den beobachteten Geschlechterunterschieden in der Fibroseentwicklung führen. Die Untersuchung der Kollagenexpressionen in diesem Mausmodell stand im Einklang mit dem histologisch nachgewiesenen erhöhten Kollagengehalt. Die Expressionen der Gene Col1 und Col3 nach zwei Wochen scheinen für die geschlechtsabhängige Fibroseentwicklung nach neun Wochen verantwortlich zu sein (Abbildung 4.31 A/C). Das Expressionsmuster dieser Gene wies die gleiche Verteilung auf, die im Fibrosescore zu erkennen war (Abbildung 4.28). In der späten Phase der Hypertrophie konnte in den Genexpressionen der Kollagene ein weiterer Anstieg gezeigt werden, der jedoch keine signifikanten Geschlechterunterschiede aufwies. Eine gesteigerte Kollagenablagerung führt zu einer gesteigerten Steifheit des Myokards und ist meist mit strukturellen Veränderungen und einer zellulären Unordnung assoziiert. Diese Eigenschaften führen meist zu einer Kontraktilitätsstörung und damit zur Dysfunktion des Myokards [122,207].

Das kardiale Remodeling in der EZM in Tiermodellen mit Druck- und Volumenüberbelastung sowie in Ischämie und nicht- ischämischer Kardiomyopathie beim Menschen werden partiell durch die MMP und ihre Inhibitoren vermittelt[208]. Die TIMP sind spezifische Inhibitoren der MMP, die den Abbau der extrazellulären Matrix (EZM) hemmen. Bedeutsam für das Bindegewebe ist das Gleichgewicht zwischen MMP und TIMP[208]. Bei pathologischen Zuständen, wie MI, Hypertrophie und Herzinsuffizienz ist das Verhältnis zwischen MMP und TIMP nicht ausbalanciert [7,131,132]. Erhöhte TIMP-Mengen können zur Matrix- Akkumulation führen, da die Aktivität der Kollagenasen durch diese inhibiert werden kann. Die TIMP binden mit hoher Affinität an spezifische MMP, diese Komplexbildung führt zur irreversiblen Inaktivierung der MMP. TIMP1 und TIMP3 binden vorzugsweise an MMP9, TIMP2 an MMP2, wobei TIMP1 als Inhibitor sämtlicher MMP gilt [209].

Es sollte untersucht werden, inwieweit die MMP und TIMP zu den beobachteten Geschlechterunterschieden in der kardialen Fibrose beigetragen haben könnten. Dafür fokussierte sich die Untersuchung in dieser Arbeit auf die Genexpressionen von MMP2 und MMP9 (Abbildung 4.32, Abbildung 4.33) sowie deren Inhibitoren TIMP1 und TIMP2 (Abbildung 4.34, Abbildung 4.35).

Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente konnte gezeigt werden, dass die MMP2- und MMP9- Genexpressionen zu beiden Zeitpunkten verschieden und darüber hinaus gegenläufig waren. Zum frühen Zeitpunkt wurden keine signifikanten Veränderungen in den Genexpressionen gezeigt. In der späten Phase der Hypertrophie konnte ein enormer Anstieg der MMP2- Genexpression nach TAC beobachtet werden, wohingegen die Expression von MMP9 in den TAC- Gruppen signifikant reduziert war. Die Inhibitoren TIMP1 und TIMP2 zeigten eine starke Induktion in ihrer Genexpression neun Wochen nach TAC. In der frühen Phase hingegen konnte nur in der TIMP1- Genexpression ein Anstieg bei Hypertrophie beobachtet werden.

Es scheint, dass MMP9 durch TIMP1 neun Wochen nach TAC inhibiert wird und dies zur Akkumulation von Kollagenen im Myokard führt. Eine Inhibierung von MMP2 lag in diesem Tiermodell nicht vor. Geschlechterunterschiede oder ein Einfluss des Östrogenrezeptors β konnten in den untersuchten Expressionsdaten der am Remodeling beteiligten Enzyme nicht gezeigt werden. In einem ähnlichen transgenen Mausmodell demonstrierten Kuster et. al acht Wochen nach TAC einen Anstieg in der MMP2- und TIMP2- Genexpression [210], was den vorliegenden Daten entspricht. In Patienten mit Aortenstenose konnte von Heymans et. al exakt das gleiche Expressionsmuster für die in dieser Arbeit untersuchten Gene nachgewiesen werden [211]. Fielitz et al. zeigten in einem Rattenmodell mit drucklast- induzierter Hypertrophie nach vier Wochen ein ähnliches Expressionsmuster für die Gene MMP2, TIMP1 und TIMP2 [212]. In einer weiteren Studie konnte bei Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz eine Herabregulation für MMP9 demonstriert werden, während andere MMP keine Veränderungen ihrer Expression zeigten [213].

Eine Vielzahl von Studien belegen, dass es viele Gemeinsamkeiten, aber auch deutliche Unterschiede in der Genexpression der MMP und TIMP gibt [7,210,211,212]. Diese scheinen vor allem vom pathologischen Stimulus sowie vom untersuchten Zeitpunkt abhängig zu sein. Die meisten Tiermodelle mit drucklast- induzierter Hypertrophie zeigten, dass ein früher Anstieg der relativen TIMP- Expression zur Matrixakkumulation und zu Fibrose führt. Bei anhaltendem pathologischem Stimulus steigen die MMP- Expressionen weiter an, begleitet von systolischer Dysfunktion.

Demnach unterstützen die Genexpressionsdaten und der Fibrosescore die Folgerungen aus den Mikroarray- Daten bezüglich der Remodeling- Prozesse. Die erhöhten und geschlechtsspezifischen Kollagenexpressionen stehen im Einklang mit den beschriebenen Veränderungen der kardialen Funktion.

5.6 Geschlechterunterschiede in der Apoptose

Einige Studien belegen die Induktion des programmierten Zelltodes bei maladaptiver Hypertrophie sowie bei Herzinsuffizienz. Geschlechterunterschiede sind kaum beschrieben worden und werden kontrovers diskutiert. Jedoch konnte gezeigt werden, dass Östrogen die Apoptose von Kardiomyozyten *in vitro* und *in vivo* in weiblichen Mäusen nach myokardialen Infarkt inhibiert [214]. Dies ist ein wichtiger Aspekt im Hinblick auf die Tatsache, dass ein altersabhängiger Kardiomyozytenverlust des linken Ventrikels nur in männlichen Patienten festgestellt wurde [153,215].

Die immunhistochemischen Analysen verifizierten die Daten aus der Mikroarray- Analyse (Abbildung 4.36). Apoptotische Zellen wurden ausschließlich in männlichen Tieren mit ER β - Deletion gefunden, alle anderen untersuchten Tiergruppen wiesen sie nur vereinzelt auf. Die Progression der Apoptose wird dabei offensichtlich durch den Verlust von ER β beschleunigt, denn in den männlichen WT- Tieren trat nach TAC- Induktion kein ähnliches apoptotisches Signalmuster auf. Die Induktion der Apoptose könnte neben der akzelerierten Fibrose eine weitere Erklärung für die verminderte Masse des Myokards und kardialer Funktion liefern, die in männlichen ER $\beta^{-/-}$ - Tieren beobachtet wurden.

Dabei bleibt die Frage offen, ob und wie der programmierte Zelltod geschlechtsspezifisch reguliert wird. Der Zelltod konnte zum Neun- Wochen- Zeitpunkt nach TAC in den weiblichen Tieren mit ER β - Deletion nicht nachgewiesen werden. Denkbar wäre das Auftreten apoptotischer Prozesse zu einem späteren Zeitpunkt in den weiblichen ER $\beta^{-/-}$ nach TAC-Induktion, denn die Mikroarray-Daten zeigten die Induktion einiger Apoptose-assoziiierter Gene. Weiterführende Experimente für die Untersuchung der Apoptose-Regulation in diesem Tiermodell sind geplant (siehe Ausblick).

5.7 Fazit

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass sich neun Wochen nach Induktion einer TAC eine kardiale Hypertrophieentwicklung mit signifikanten Geschlechterunterschieden in den behandelten Tieren entwickelte. Die Hypertrophie wurde mit Einschränkungen der linksventrikulären Funktion in der Systole und Diastole und beginnender Dilatation, den Merkmalen für eine Herzinsuffizienz, begleitet. Zu diesem Zeitpunkt entwickelten weibliche WT- Tiere weniger Hypertrophie als die männliche Vergleichsgruppe. Ferner konnte beobachtet werden, dass der Verlust des ER β in männlichen scheinoperierten Tieren zu einem systolischen Funktionsverlust führte und sich bei kardialer Hypertrophie tendenziell, jedoch nicht signifikant verstärkte. Im Vergleich dazu konnten die weiblichen Tiere die systolische Herzfunktion besser aufrechterhalten. Durch die Mikroarray-Analysen konnte festgestellt werden, dass die

Expression mitochondrialer Gene in den weiblichen WT- Tieren nach TAC höher war als in den männlichen Tieren und damit möglicherweise eine bessere Sauerstoffversorgung gewährleistet werden konnte. Dieser Geschlechterunterschied in der Regulation des kardialen Stoffwechsels scheint über PPAR α und die Glukosetransporter GLUT1 vermittelt zu werden. Des Weiteren entwickelten WT- Weibchen neun Wochen nach TAC– Induktion weniger Fibrose als die männliche Kontrollgruppe, wohingegen eine stärkere Fibrose in weiblichen ER $\beta^{-/-}$ Mäusen festgestellt wurde. Der Verlust von ER β forciert in männlichen Tieren die Progression der Hypertrophie sowie die Induktion apoptotischer Signalwege.

Aus den gewonnenen Resultaten lässt sich ein hypothetisches Modell für die vorliegende Studie ableiten (Abbildung 5.2). Bei Betrachtung der gewonnenen Informationen auf einer Zeitachse weist diese Arbeit auf eine protektive Rolle des ER β in der Entwicklung einer linksventrikulären Myokardhypertrophie in beiden Geschlechtern hin.

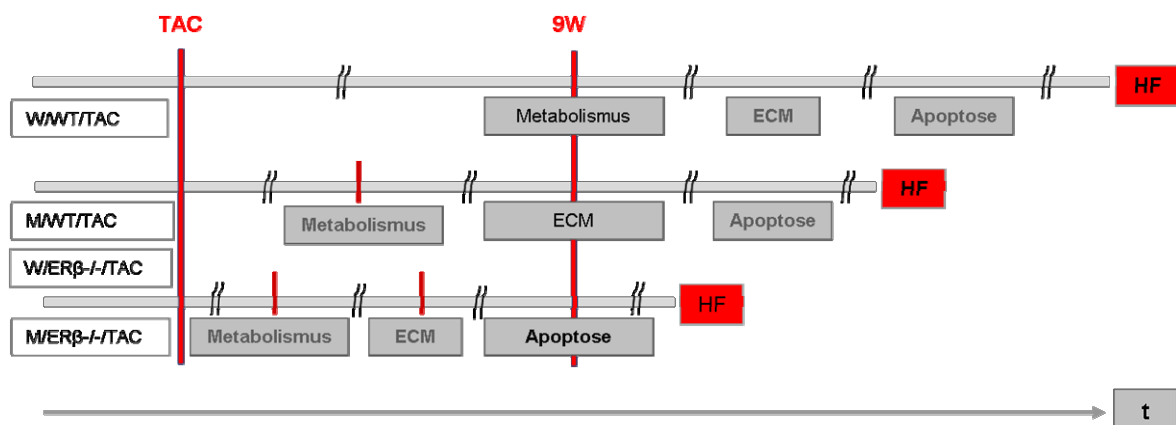


Abbildung 5.2: Hypothetisches Modell für den zeitlichen Verlauf der Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz.

ER β scheint in weiblichen Tieren die Entwicklung einer kardialen Fibrose verhindern bzw. verlangsamen zu können, während in den männlichen Tieren ein starker Funktionsverlust des Herzens und apoptotischer Prozesse durch ER β verlangsamt oder inhibiert werden können. Der Übergang in die Herzinsuffizienz wird durch ER β gedrosselt.

5.8 Limitationen

Die transversale Aortenkonstriktion (TAC) ist ein anerkanntes und reproduzierbares Modell um eine Hypertrophie artifiziell zu induzieren. Dennoch treten bei gleichgeschlechtlichen Tieren desselben Maustammes Unterschiede in der Hypertrophieentwicklung sowie in der Progression in die Herzinsuffizienz auf. Diese

Unterschiede unterliegen biologischen und individuellen Schwankungen, die als physiologisch zu betrachten sind. Weitere mögliche Gründe für die Variabilität in der Hypertrophieentwicklung könnten eine Lockerung des Knotens oder ein Einwachsen des Fadens in die Aortenwand sein [216]. Für die Konstriktion wird die Aorta exponiert, dafür muss Bindegewebe entfernt werden. Hier könnte die entfernte Menge des Bindegewebes ebenso variieren. Die Einflüsse waren minimal, da entsprechende Signifikanzniveaus erreicht wurden.

Die Charakterisierung der Myokardfunktion wurde mittels Echokardiographie und TIP-Katheter- Messung durchgeführt. Diese Methoden werden in einer Vielzahl von tierexperimentellen Versuchen angewandt und sind etablierte Standardmethoden. Eine genauere Analyse der diastolischen und systolischen Herzfunktion wäre mit einem Konduktanzmessgerät zu erzielen. Mit diesem könnte das Druck-Volumen- Verhältnis bestimmt werden, wohingegen mit dem TIP- Katheter nur Druckverhältnisse dargestellt werden.

Die Zeitpunkte für dieses Tiermodell und die Wahl der 26-Gauge-Nadel für die Konstriktion wurden aufgrund beschriebener Daten aus der aktuellen Literatur gewählt [160,217]. Es ist nicht auszuschließen, dass zu einem späteren Zeitpunkt und bei Verwendung einer dünneren Nadel ein ausgeprägteres Krankheitsbild in allen untersuchten Tiergruppen vorliegen könnte [60]. Dies hätte möglicherweise Veränderungen in biologischen Prozessen, einhergehend mit einem veränderten globalen Gen- und Proteinexpressionsmuster zur Folge.

6. Ausblick

Die vorliegende Studie zeigte einen deutlichen Einfluss des Östrogenrezeptors β auf die kardialen Prozesse als Antwort auf eine chronische Drucklast. Die Resultate zeigten, dass sich das weibliche Geschlecht bzw. Geschlechtshormone, wie das Östrogen, in Hinsicht auf eine myokardiale Hypertrophieentwicklung positiv auswirken. Der Östrogenrezeptor β beeinflusst den kardialen Metabolismus, die Fibrose und die Apoptose positiv.

Nach Evaluierung spezifischer Prozesse bei Myokardhypertrophie mittels Mikroarray-Analysen kann der Fokus nun auf eine detaillierte funktionelle Untersuchung einzelner Gene und Proteine gerichtet werden. Besonderes Augenmerk sollte hierbei auf die Regulierung weiterer für den kardialen Metabolismus und die Apoptose relevanter Gene gerichtet werden, die unter dem Einfluss der Östrogenrezeptoren stehen könnten.

Die vorliegende Studie ergab Hinweise auf geschlechts- und genotypabhängige Veränderungen im kardialen Metabolismus und der Apoptose. Diese Prozesse sind vornehmlich in den Mitochondrien lokalisiert. Aus diesem Grund fokussiert sich die weitere Arbeit auf die Untersuchung der Mitochondrienfunktionen in den verschiedenen Gruppen.

Dabei stellen sich folgende Fragen:

Was trägt zur relativ erhöhten Expression mitochondrialer Gene in weiblichen Mäusen bei?

- a. Liegt eine höhere mitochondriale Kapazität vor?
- b. Ist die Anzahl der Mitochondrien in weiblichen Tieren erhöht?
- c. Ist die Sauerstoffversorgung und damit die ATP- Bildung in weiblichen Tieren effizienter als in männlichen Tieren?

Oxidativer Stress und damit verbundener Sauerstoffmangel führen zur Bildung von freien Radikalen. Die Untersuchung der Radikalbildungen ist deshalb für den zukünftigen Erkenntnisgewinn notwendig. Die strukturelle Bestimmung durch histologische Untersuchungen der Mitochondrien kann zeigen, ob und wie stark die Mitochondrien in den Tieren zerstört oder verändert sind. Diese Untersuchungen sind nicht nur für den kardialen Metabolismus, sondern auch für die nähere Analyse der apoptotischen Prozesse von Bedeutung. Weiterhin soll die Apoptoseinduktion untersucht und festgestellt werden, ob diese geschlechtsspezifisch reguliert wird. Möglicherweise sind die Östrogenrezeptoren für die beobachteten geschlechtsspezifischen Veränderungen verantwortlich. Aus der Literatur ist bekannt, dass Östrogenrezeptoren in den Mitochondrien von MCF7-Zellen lokalisiert sind, eine Stimulation mit Östrogen zu einer erhöhten Aktivität der Östrogenrezeptoren führt und die mitochondriale Kapazität für die

oxidative Phosphorylierung zunimmt [115]. Zur Überprüfung dieser Resultate wäre eine gleichartige Behandlung von Kardiomyozyten sinnvoll. Denkbar ist ebenfalls ein experimenteller Tierversuch, in dem spezielle Wirkungsmechanismen von Östrogen, selektive Östrogenmodulatoren (SERMs), Androgen und Progesteron sowie Östrogenrezeptoragonisten und -antagonisten auf eine drucklast- induzierte Myokardhypertrophie in weiblichen und männlichen Tieren untersucht werden.

Literaturverzeichnis

- [1] Levy, D.; Garrison, R. J.; Savage, D. D.; Kannel, W. B. and Castelli, W. P. (1990): Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study, *N Engl J Med* 322 [22], pp. 1561-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2139921](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=2139921)
- [2] Lips, D. J.; deWindt, L. J.; van Kraaij, D. J. and Doevendans, P. A. (2003): Molecular determinants of myocardial hypertrophy and failure: alternative pathways for beneficial and maladaptive hypertrophy, *Eur Heart J* 24 [10], pp. 883-96. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12714020](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12714020)
- [3] Ritchie, R. H. and Delbridge, L. M. (2006): Cardiac hypertrophy, substrate utilization and metabolic remodelling: cause or effect?, *Clin Exp Pharmacol Physiol* 33 [1-2], pp. 159-66. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16445716](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16445716)
- [4] Huss, J. M. and Kelly, D. P. (2005): Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance, *J Clin Invest* 115 [3], pp. 547-55. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15765136](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15765136)
- [5] Frey, N.; Katus, H. A.; Olson, E. N. and Hill, J. A. (2004): Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target?, *Circulation* 109 [13], pp. 1580-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15066961](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15066961)
- [6] Frey, N. and Olson, E. N. (2003): Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly, *Annu Rev Physiol* 65, pp. 45-79. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12524460](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12524460)
- [7] Spinale, F. G. (2002): Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart, *Circ Res* 90 [5], pp. 520-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11909815](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11909815)
- [8] Meijis, M. F.; de Windt, L. J.; de Jonge, N.; Cramer, M. J.; Bots, M. L.; Mali, W. P. and Doevendans, P. A. (2007): Left ventricular hypertrophy: a shift in paradigm, *Curr Med Chem* 14 [2], pp. 157-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17266575](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17266575)
- [9] Lorell, B. H. and Carabello, B. A. (2000): Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis, *Circulation* 102 [4], pp. 470-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10908222](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10908222)
- [10] Schwartzbauer, G. and Robbins, J. (2001): Matters of sex: sex matters, *Circulation* 104 [12], pp. 1333-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11560846](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11560846)
- [11] Rosamond, W.; Flegal, K.; Furie, K.; Go, A.; Greenlund, K.; Haase, N.; Hailpern, S. M.; Ho, M.; Howard, V.; Kissela, B.; Kittner, S.; Lloyd-Jones, D.; McDermott, M.; Meigs, J.; Moy, C.; Nichol, G.; O'Donnell, C.; Roger, V.; Sorlie, P.; Steinberger, J.; Thom, T.; Wilson, M. and Hong, Y. (2008): Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee

- and Stroke Statistics Subcommittee, *Circulation* 117 [4], pp. e25-146. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18086926
- [12] Thom, T.; Haase, N.; Rosamond, W.; Howard, V. J.; Rumsfeld, J.; Manolio, T.; Zheng, Z. J.; Flegal, K.; O'Donnell, C.; Kittner, S.; Lloyd-Jones, D.; Goff, D. C., Jr.; Hong, Y.; Adams, R.; Friday, G.; Furie, K.; Gorelick, P.; Kissela, B.; Marler, J.; Meigs, J.; Roger, V.; Sidney, S.; Sorlie, P.; Steinberger, J.; Wasserthiel-Smoller, S.; Wilson, M. and Wolf, P. (2006): Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, *Circulation* 113 [6], pp. e85-151. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16407573
- [13] Silber, D. H. (2003): Heart failure in women, *Curr Womens Health Rep* 3 [2], pp. 104-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12628079
- [14] Liao, Y.; Cooper, R. S.; Mensah, G. A. and McGee, D. L. (1995): Left ventricular hypertrophy has a greater impact on survival in women than in men, *Circulation* 92 [4], pp. 805-10. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=7641360
- [15] DeStefano, A. L.; Larson, M. G.; Mitchell, G. F.; Benjamin, E. J.; Vasan, R. S.; Li, J.; Corey, D. and Levy, D. (2004): Genome-wide scan for pulse pressure in the National Heart, Lung and Blood Institute's Framingham Heart Study, *Hypertension* 44 [2], pp. 152-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15210652
- [16] Fox, C. S.; Yang, Q.; Cupples, L. A.; Guo, C. Y.; Atwood, L. D.; Murabito, J. M.; Levy, D.; Mendelsohn, M. E.; Housman, D. E. and Shearman, A. M. (2005): Sex-specific association between estrogen receptor-alpha gene variation and measures of adiposity: the Framingham Heart Study, *J Clin Endocrinol Metab* 90 [11], pp. 6257-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16144952
- [17] Cleland, J. G.; Swedberg, K.; Follath, F.; Komajda, M.; Cohen-Solal, A.; Aguilar, J. C.; Dietz, R.; Gavazzi, A.; Hobbs, R.; Korewicki, J.; Madeira, H. C.; Moiseyev, V. S.; Preda, I.; van Gilst, W. H.; Widimsky, J.; Freemantle, N.; Eastaugh, J. and Mason, J. (2003): The EuroHeart Failure survey programme-- a survey on the quality of care among patients with heart failure in Europe. Part 1: patient characteristics and diagnosis, *Eur Heart J* 24 [5], pp. 442-63. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12633546
- [18] Carroll, J. D.; Carroll, E. P.; Feldman, T.; Ward, D. M.; Lang, R. M.; McGaughey, D. and Karp, R. B. (1992): Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly, *Circulation* 86 [4], pp. 1099-107. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=1394918
- [19] Kostkiewicz, M.; Tracz, W.; Olszowska, M.; Podolec, P. and Drop, D. (1999): Left ventricular geometry and function in patients with aortic stenosis: gender differences, *Int J Cardiol* 71 [1], pp. 57-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10522565

- [20] Aurigemma, G. P. and Gaasch, W. H. (1995): Gender differences in older patients with pressure-overload hypertrophy of the left ventricle, *Cardiology* 86 [4], pp. 310-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=7553706
- [21] Bhatia, R. S.; Tu, J. V.; Lee, D. S.; Austin, P. C.; Fang, J.; Haouzi, A.; Gong, Y. and Liu, P. P. (2006): Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study, *N Engl J Med* 355 [3], pp. 260-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16855266
- [22] Owan, T. E.; Hodge, D. O.; Herges, R. M.; Jacobsen, S. J.; Roger, V. L. and Redfield, M. M. (2006): Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction, *N Engl J Med* 355 [3], pp. 251-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16855265
- [23] Regitz-Zagrosek, V.; Lehmkuhl, E. and Lehmkuhl, H. B. (2008): [Heart failure--are there gender aspects?], *Internist (Berl)* 49 [4], pp. 422-6, 428. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18301870
- [24] Regitz-Zagrosek, V.; Lehmkuhl, E.; Lehmkuhl, H. B. and Hetzer, R. (2004): Gender aspects in heart failure. Pathophysiology and medical therapy, *Arch Mal Coeur Vaiss* 97 [9], pp. 899-908. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15521484
- [25] Mendes, L. A.; Jacobs, A. K.; Davidoff, R. and Ryan, T. J. (1999): The gender paradox, *Rev Port Cardiol* 18 Suppl 3, pp. III21-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10574019
- [26] Farquhar, C. M.; Marjoribanks, J.; Lethaby, A.; Lamberts, Q. and Suckling, J. A. (2005): Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women, *Cochrane Database Syst Rev* [3], p. CD004143. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16034922
- [27] Hayward, C. S.; Kelly, R. P. and Collins, P. (2000): The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function, *Cardiovasc Res* 46 [1], pp. 28-49. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10727651
- [28] Leinwand, L. A. (2003): Sex is a potent modifier of the cardiovascular system, *J Clin Invest* 112 [3], pp. 302-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12897194
- [29] Hayward, C. S.; Webb, C. M. and Collins, P. (2001): Effect of sex hormones on cardiac mass, *Lancet* 357 [9265], pp. 1354-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11343761
- [30] Hulley, S. B. and Grady, D. (2004): The WHI estrogen-alone trial--do things look any better?, *Jama* 291 [14], pp. 1769-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15082705
- [31] Schonfelder, G. (2005): The biological impact of estrogens on gender differences in congestive heart failure, *Cardiovasc Res* 67 [4], pp. 573-4. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16000195
- [32] Grady, D. (2003): Postmenopausal hormones--therapy for symptoms only, *N Engl J Med* 348 [19], pp. 1835-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12642636
- [33] Mendelsohn, M. E. and Karas, R. H. (2005): Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences, *Science* 308 [5728], pp. 1583-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15947175
- [34] Mendelsohn, M. E. and Karas, R. H. (1999): The protective effects of estrogen on the cardiovascular system, *N Engl J Med* 340 [23], pp. 1801-11. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10362825
- [35] Nordmeyer, J.; Eder, S.; Mahmoodzadeh, S.; Martus, P.; Fielitz, J.; Bass, J.; Bethke, N.; Zurbrugg, H. R.; Pregla, R.; Hetzer, R. and Regitz-Zagrosek, V. (2004): Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis, *Circulation* 110 [20], pp. 3270-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15533858
- [36] Mahmoodzadeh, S.; Eder, S.; Nordmeyer, J.; Ehler, E.; Huber, O.; Martus, P.; Weiske, J.; Pregla, R.; Hetzer, R. and Regitz-Zagrosek, V. (2006): Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure, *Faseb J* 20 [7], pp. 926-34. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16675850
- [37] Grohe, C.; Kahlert, S.; Lobbert, K.; Stimpel, M.; Karas, R. H.; Vetter, H. and Neyses, L. (1997): Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors, *FEBS Lett* 416 [1], pp. 107-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9369244
- [38] Kuiper, G. G.; Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Nilsson, S. and Gustafsson, J. A. (1996): Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary, *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 [12], pp. 5925-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8650195
- [39] Walter, P.; Green, S.; Greene, G.; Krust, A.; Bornert, J. M.; Jeltsch, J. M.; Staub, A.; Jensen, E.; Scrace, G.; Waterfield, M. and et al. (1985): Cloning of the human estrogen receptor cDNA, *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 [23], pp. 7889-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=3865204
- [40] Menasce, L. P.; White, G. R.; Harrison, C. J. and Boyle, J. M. (1993): Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique, *Genomics* 17 [1], pp. 263-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8406468
- [41] Enmark, E.; Peltö-Huikko, M.; Grandien, K.; Lagercrantz, S.; Lagercrantz, J.; Fried, G.; Nordenskjöld, M. and Gustafsson, J. A. (1997): Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern, *J Clin Endocrinol Metab* 82 [12], pp. 4258-65. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9398750

- [42] Zhao, C.; Dahlman-Wright, K. and Gustafsson, J. A. (2008): Estrogen receptor beta: an overview and update, *Nucl Recept Signal* 6, p. e003. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18301783
- [43] Brzozowski, A. M.; Pike, A. C.; Dauter, Z.; Hubbard, R. E.; Bonn, T.; Engstrom, O.; Ohman, L.; Greene, G. L.; Gustafsson, J. A. and Carlquist, M. (1997): Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor, *Nature* 389 [6652], pp. 753-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9338790
- [44] Klein-Hitpass, L.; Schorpp, M.; Wagner, U. and Ryffel, G. U. (1986): An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus* vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells, *Cell* 46 [7], pp. 1053-61. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=3463433
- [45] Shibata, H.; Spencer, T. E.; Onate, S. A.; Jenster, G.; Tsai, S. Y.; Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (1997): Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action, *Recent Prog Horm Res* 52, pp. 141-64; discussion 164-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9238851
- [46] Evans, R. M. (1988): The steroid and thyroid hormone receptor superfamily, *Science* 240 [4854], pp. 889-95. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=3283939
- [47] Mendelsohn, M. E. (2000): Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system, *J Steroid Biochem Mol Biol* 74 [5], pp. 337-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11162942
- [48] Mendelsohn, M. E. (2000): Nongenomic, ER-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase: how does it work? What does it mean?, *Circ Res* 87 [11], pp. 956-60. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11090536
- [49] Bjornstrom, L. and Sjoberg, M. (2005): Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes, *Mol Endocrinol* 19 [4], pp. 833-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15695368
- [50] O'Lone, R.; Knorr, K.; Jaffe, I. Z.; Schaffer, M. E.; Martini, P. G.; Karas, R. H.; Bienkowska, J.; Mendelsohn, M. E. and Hansen, U. (2007): Estrogen receptors alpha and beta mediate distinct pathways of vascular gene expression, including genes involved in mitochondrial electron transport and generation of reactive oxygen species, *Mol Endocrinol* 21 [6], pp. 1281-96. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17374850
- [51] Grohe, C.; Kahlert, S.; Lobbert, K.; Meyer, R.; Linz, K. W.; Karas, R. H. and Vetter, H. (1996): Modulation of hypertensive heart disease by estrogen, *Steroids* 61 [4], pp. 201-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8733001
- [52] Regitz-Zagrosek, V.; Lehmkuhl, E. and Weickert, M. O. (2006): Gender differences in the metabolic syndrome and their role for cardiovascular disease, *Clin Res*

- Cardiol 95 [3], pp. 136-47. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16598526
- [53] van Eickels, M.; Patten, R. D.; Aronovitz, M. J.; Alsheikh-Ali, A.; Gostyla, K.; Celestin, F.; Grohe, C.; Mendelsohn, M. E. and Karas, R. H. (2003): 17-beta-estradiol increases cardiac remodeling and mortality in mice with myocardial infarction, *J Am Coll Cardiol* 41 [11], pp. 2084-92. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12798586
- [54] van Eickels, M.; Grohe, C.; Cleutjens, J. P.; Janssen, B. J.; Wellens, H. J. and Doevendans, P. A. (2001): 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy, *Circulation* 104 [12], pp. 1419-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11560859
- [55] Patten, R. D.; Pourati, I.; Aronovitz, M. J.; Alsheikh-Ali, A.; Eder, S.; Force, T.; Mendelsohn, M. E. and Karas, R. H. (2008): 17 Beta-estradiol differentially affects left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy following myocardial infarction and pressure overload, *J Card Fail* 14 [3], pp. 245-53. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18381189
- [56] Babiker, F. A.; Lips, D.; Meyer, R.; Delvaux, E.; Zandberg, P.; Janssen, B.; van Eys, G.; Grohe, C. and Doevendans, P. A. (2006): Estrogen receptor beta protects the murine heart against left ventricular hypertrophy, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 [7], pp. 1524-30. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16627800
- [57] Babiker, F. A.; Lips, D. J.; Delvaux, E.; Zandberg, P.; Janssen, B. J.; Prinzen, F.; van Eys, G.; Grohe, C. and Doevendans, P. A. (2007): Oestrogen modulates cardiac ischaemic remodelling through oestrogen receptor-specific mechanisms, *Acta Physiol (Oxf)* 189 [1], pp. 23-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17280554
- [58] Pedram, A.; Razandi, M.; Lubahn, D.; Liu, J.; Vannan, M. and Levin, E. R. (2008): Estrogen Inhibits Cardiac Hypertrophy: Role of Estrogen Receptor- β to Inhibit Calcineurin, *Endocrinology* 149 [7], pp. 3361-3369. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18372323
- [59] Pelzer, T.; Loza, P. A.; Hu, K.; Bayer, B.; Dienesch, C.; Calvillo, L.; Couse, J. F.; Korach, K. S.; Neyses, L. and Ertl, G. (2005): Increased mortality and aggravation of heart failure in estrogen receptor-beta knockout mice after myocardial infarction, *Circulation* 111 [12], pp. 1492-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15781739
- [60] Skavdahl, M.; Steenbergen, C.; Clark, J.; Myers, P.; Demianenko, T.; Mao, L.; Rockman, H. A.; Korach, K. S. and Murphy, E. (2005): Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288 [2], pp. H469-76. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15374829
- [61] Bing, R. J. (1954): The metabolism of the heart, *Harvey Lect* 50, pp. 27-70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=13306034

-
- [62] Bing, R. J.; Siegel, A.; Ungar, I. and Gilbert, M. (1954): Metabolism of the human heart. II. Studies on fat, ketone and amino acid metabolism, *Am J Med* 16 [4], pp. 504-15. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=13148192
- [63] Neely, J. R.; Rovetto, M. J. and Oram, J. F. (1972): Myocardial utilization of carbohydrate and lipids, *Prog Cardiovasc Dis* 15 [3], pp. 289-329. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=4564017
- [64] Lockwood, E. A. and Bailey, E. (1970): Fatty acid utilization during development of the rat, *Biochem J* 120 [1], pp. 49-54. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=5494228
- [65] Finck, B. N.; Lehman, J. J.; Barger, P. M. and Kelly, D. P. (2002): Regulatory networks controlling mitochondrial energy production in the developing, hypertrophied, and diabetic heart, *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 67, pp. 371-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12858562
- [66] Sack, M. N.; Rader, T. A.; Park, S.; Bastin, J.; McCune, S. A. and Kelly, D. P. (1996): Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart, *Circulation* 94 [11], pp. 2837-42. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8941110
- [67] Swynghedauw, B. (1999): Molecular mechanisms of myocardial remodeling, *Physiol Rev* 79 [1], pp. 215-62. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9922372
- [68] Kelly, D. P. and Scarpulla, R. C. (2004): Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function, *Genes Dev* 18 [4], pp. 357-68. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15004004
- [69] Desvergne, B.; Michalik, L. and Wahli, W. (2006): Transcriptional regulation of metabolism, *Physiol Rev* 86 [2], pp. 465-514. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16601267
- [70] Huss, J. M. and Kelly, D. P. (2004): Nuclear receptor signaling and cardiac energetics, *Circ Res* 95 [6], pp. 568-78. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15375023
- [71] Finck, B. N. (2007): The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease, *Cardiovasc Res* 73 [2], pp. 269-77. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17010956
- [72] Michalik, L.; Desvergne, B.; Tan, N. S.; Basu-Modak, S.; Escher, P.; Rieusset, J.; Peters, J. M.; Kaya, G.; Gonzalez, F. J.; Zakany, J.; Metzger, D.; Chambon, P.; Duboule, D. and Wahli, W. (2001): Impaired skin wound healing in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPARbeta mutant mice, *J Cell Biol* 154 [4], pp. 799-814. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11514592
-

-
- [73] Michalik, L. and Wahli, W. (2006): Involvement of PPAR nuclear receptors in tissue injury and wound repair, *J Clin Invest* 116 [3], pp. 598-606. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16511592
- [74] Barger, P. M. and Kelly, D. P. (2000): PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism, *Trends Cardiovasc Med* 10 [6], pp. 238-45. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11282301
- [75] Desvergne, B. and Wahli, W. (1999): Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism, *Endocr Rev* 20 [5], pp. 649-88. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10529898
- [76] Chinetti, G.; Fruchart, J. C. and Staels, B. (2000): Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation, *Inflamm Res* 49 [10], pp. 497-505. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11089900
- [77] A, I. Jpenberg; Jeannin, E.; Wahli, W. and Desvergne, B. (1997): Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element, *J Biol Chem* 272 [32], pp. 20108-17. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9242684
- [78] A, I. Jpenberg; Tan, N. S.; Gelman, L.; Kersten, S.; Seydoux, J.; Xu, J.; Metzger, D.; Canaple, L.; Chambon, P.; Wahli, W. and Desvergne, B. (2004): In vivo activation of PPAR target genes by RXR homodimers, *Embo J* 23 [10], pp. 2083-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15103326
- [79] Robyr, D.; Wolffe, A. P. and Wahli, W. (2000): Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks, *Mol Endocrinol* 14 [3], pp. 329-47. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10707952
- [80] Feige, J. N.; Gelman, L.; Michalik, L.; Desvergne, B. and Wahli, W. (2006): From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions, *Prog Lipid Res* 45 [2], pp. 120-59. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16476485
- [81] Lehman, J. J. and Kelly, D. P. (2002): Gene regulatory mechanisms governing energy metabolism during cardiac hypertrophic growth, *Heart Fail Rev* 7 [2], pp. 175-85. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11988641
- [82] Kelly, D. P. (2003): PPARs of the heart: three is a crowd, *Circ Res* 92 [5], pp. 482-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12649261
- [83] Smeets, P. J.; Teunissen, B. E.; Willemsen, P. H.; van Nieuwenhoven, F. A.; Brouns, A. E.; Janssen, B. J.; Cleutjens, J. P.; Staels, B.; van der Vusse, G. J. and van Bilsen, M. (2008): Cardiac hypertrophy is enhanced in PPAR alpha-/- mice in
-

- response to chronic pressure overload, *Cardiovasc Res* 78 [1], pp. 79-89. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18187461
- [84] Gilde, A. J.; van der Lee, K. A.; Willemsen, P. H.; Chinetti, G.; van der Leij, F. R.; van der Vusse, G. J.; Staels, B. and van Bilsen, M. (2003): Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and PPARbeta/delta, but not PPARgamma, modulate the expression of genes involved in cardiac lipid metabolism, *Circ Res* 92 [5], pp. 518-24. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12600885
- [85] Baar, K.; Wende, A. R.; Jones, T. E.; Marison, M.; Nolte, L. A.; Chen, M.; Kelly, D. P. and Holloszy, J. O. (2002): Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1, *Faseb J* 16 [14], pp. 1879-86. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12468452
- [86] Barish, G. D.; Narkar, V. A. and Evans, R. M. (2006): PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome, *J Clin Invest* 116 [3], pp. 590-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16511591
- [87] Cheng, L.; Ding, G.; Qin, Q.; Huang, Y.; Lewis, W.; He, N.; Evans, R. M.; Schneider, M. D.; Brako, F. A.; Xiao, Y.; Chen, Y. E. and Yang, Q. (2004): Cardiomyocyte-restricted peroxisome proliferator-activated receptor-delta deletion perturbs myocardial fatty acid oxidation and leads to cardiomyopathy, *Nat Med* 10 [11], pp. 1245-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15475963
- [88] Hihi, A. K.; Michalik, L. and Wahli, W. (2002): PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives, *Cell Mol Life Sci* 59 [5], pp. 790-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12088279
- [89] Asakawa, M.; Takano, H.; Nagai, T.; Uozumi, H.; Hasegawa, H.; Kubota, N.; Saito, T.; Masuda, Y.; Kadowaki, T. and Komuro, I. (2002): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma plays a critical role in inhibition of cardiac hypertrophy in vitro and in vivo, *Circulation* 105 [10], pp. 1240-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11889020
- [90] Ding, G.; Fu, M.; Qin, Q.; Lewis, W.; Kim, H. W.; Fukai, T.; Bacanamwo, M.; Chen, Y. E.; Schneider, M. D.; Mangelsdorf, D. J.; Evans, R. M. and Yang, Q. (2007): Cardiac peroxisome proliferator-activated receptor gamma is essential in protecting cardiomyocytes from oxidative damage, *Cardiovasc Res* 76 [2], pp. 269-79. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17678635
- [91] Fliegner, D.; Westermann, D.; Riad, A.; Schubert, C.; Becher, E.; Fielitz, J.; Tschope, C. and Regitz-Zagrosek, V. (2008): Up-regulation of PPARgamma in myocardial infarction, *Eur J Heart Fail* 10 [1], pp. 30-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18162196
- [92] Huss, J. M.; Kopp, R. P. and Kelly, D. P. (2002): Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha (PGC-1alpha) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor-alpha and -gamma. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1alpha, *J Biol Chem* 277 [43], pp.

- 40265-74. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12181319
- [93] Lehman, J. J.; Barger, P. M.; Kovacs, A.; Saffitz, J. E.; Medeiros, D. M. and Kelly, D. P. (2000): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis, *J Clin Invest* 106 [7], pp. 847-56. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11018072
- [94] Lehman, J. J. and Kelly, D. P. (2002): Transcriptional activation of energy metabolic switches in the developing and hypertrophied heart, *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29 [4], pp. 339-45. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11985547
- [95] Huss, J. M.; Torra, I. P.; Staels, B.; Giguere, V. and Kelly, D. P. (2004): Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle, *Mol Cell Biol* 24 [20], pp. 9079-91. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15456881
- [96] Finck, B. N. and Kelly, D. P. (2006): PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease, *J Clin Invest* 116 [3], pp. 615-22. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16511594
- [97] Puigserver, P.; Wu, Z.; Park, C. W.; Graves, R.; Wright, M. and Spiegelman, B. M. (1998): A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis, *Cell* 92 [6], pp. 829-39. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9529258
- [98] Duncan, J. G.; Fong, J. L.; Medeiros, D. M.; Finck, B. N. and Kelly, D. P. (2007): Insulin-resistant heart exhibits a mitochondrial biogenic response driven by the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha/PGC-1alpha gene regulatory pathway, *Circulation* 115 [7], pp. 909-17. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17261654
- [99] Sano, M. and Schneider, M. D. (2005): Energizer: PGC-1 alpha keeps the heart going, *Cell Metab* 1 [4], pp. 216-8. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16054065
- [100] Sano, M.; Wang, S. C.; Shirai, M.; Scaglia, F.; Xie, M.; Sakai, S.; Tanaka, T.; Kulkarni, P. A.; Barger, P. M.; Youker, K. A.; Taffet, G. E.; Hamamori, Y.; Michael, L. H.; Craigen, W. J. and Schneider, M. D. (2004): Activation of cardiac Cdk9 represses PGC-1 and confers a predisposition to heart failure, *Embo J* 23 [17], pp. 3559-69. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15297879
- [101] Czubryt, M. P.; McAnally, J.; Fishman, G. I. and Olson, E. N. (2003): Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha) and mitochondrial function by MEF2 and HDAC5, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [4], pp. 1711-6. URL:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12578979
- [102] Bishop, S. P. and Altschuld, R. A. (1970): Increased glycolytic metabolism in cardiac hypertrophy and congestive failure, *Am J Physiol* 218 [1], pp. 153-9. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=4243400
- [103] Allard, M. F.; Schonekess, B. O.; Henning, S. L.; English, D. R. and Lopaschuk, G. D. (1994): Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts, *Am J Physiol* 267 [2 Pt 2], pp. H742-50. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8067430
- [104] Sambandam, N.; Lopaschuk, G. D.; Brownsey, R. W. and Allard, M. F. (2002): Energy metabolism in the hypertrophied heart, *Heart Fail Rev* 7 [2], pp. 161-73. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11988640
- [105] Razeghi, P.; Young, M. E.; Alcorn, J. L.; Moravec, C. S.; Frazier, O. H. and Taegtmeyer, H. (2001): Metabolic gene expression in fetal and failing human heart, *Circulation* 104 [24], pp. 2923-31. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11739307
- [106] Jamshidi, Y.; Montgomery, H. E.; Hense, H. W.; Myerson, S. G.; Torra, I. P.; Staels, B.; World, M. J.; Doering, A.; Erdmann, J.; Hengstenberg, C.; Humphries, S. E.; Schunkert, H. and Flavell, D. M. (2002): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene regulates left ventricular growth in response to exercise and hypertension, *Circulation* 105 [8], pp. 950-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11864924
- [107] Cheurfa, N.; Reis, A. F.; Dubois-Laforgue, D.; Bellanne-Chantelot, C.; Timsit, J. and Velho, G. (2004): The Gly482Ser polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 gene is associated with hypertension in type 2 diabetic men, *Diabetologia* 47 [11], pp. 1980-3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15599700
- [108] Valve, R.; Sivenius, K.; Miettinen, R.; Pihlajamaki, J.; Rissanen, A.; Deeb, S. S.; Auwerx, J.; Uusitupa, M. and Laakso, M. (1999): Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene are associated with severe overweight among obese women, *J Clin Endocrinol Metab* 84 [10], pp. 3708-12. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10523018
- [109] Simon, I.; Vendrell, J.; Gutierrez, C.; Fernandez-Real, J. M.; Vendrell, I.; Gallart, L.; Fontova, R. and Richart, C. (2002): Pro12Ala substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is associated with increased leptin levels in women with type-2 diabetes mellitus, *Horm Res* 58 [3], pp. 143-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12218380
- [110] Djouadi, F.; Weinheimer, C. J.; Saffitz, J. E.; Pitchford, C.; Bastin, J.; Gonzalez, F. J. and Kelly, D. P. (1998): A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator- activated receptor alpha- deficient mice, *J Clin Invest* 102 [6], pp. 1083-91. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9739042
- [111] Nohammer, C.; Brunner, F.; Wolkart, G.; Staber, P. B.; Steyrer, E.; Gonzalez, F. J.; Zechner, R. and Hoefler, G. (2003): Myocardial dysfunction and male mortality in peroxisome proliferator-activated receptor alpha knockout mice overexpressing lipoprotein lipase in muscle, *Lab Invest* 83 [2], pp. 259-69. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12594240
- [112] Keller, H.; Givel, F.; Perroud, M. and Wahli, W. (1995): Signaling cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor and estrogen receptor through estrogen response elements, *Mol Endocrinol* 9 [7], pp. 794-804. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=7476963
- [113] Komar, C. M. (2005): Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function--implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling, *Reprod Biol Endocrinol* 3, p. 41. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16131403
- [114] Foryst-Ludwig, A.; Clemenz, M.; Hohmann, S.; Hartge, M.; Sprang, C.; Frost, N.; Krikov, M.; Bhanot, S.; Barros, R.; Morani, A.; Gustafsson, J. A.; Unger, T. and Kintscher, U. (2008): Metabolic actions of estrogen receptor beta (ERbeta) are mediated by a negative cross-talk with PPARgamma, *PLoS Genet* 4 [6], p. e1000108. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18584035
- [115] Chen, J. Q.; Delannoy, M.; Cooke, C. and Yager, J. D. (2004): Mitochondrial localization of ERalpha and ERbeta in human MCF7 cells, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286 [6], pp. E1011-22. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=14736707
- [116] Yang, S. H.; Liu, R.; Perez, E. J.; Wen, Y.; Stevens, S. M., Jr.; Valencia, T.; Brun-Zinkernagel, A. M.; Prokai, L.; Will, Y.; Dykens, J.; Koulen, P. and Simpkins, J. W. (2004): Mitochondrial localization of estrogen receptor beta, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 [12], pp. 4130-5. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15024130
- [117] Demonacos, C. V.; Karayanni, N.; Hatzoglou, E.; Tsiriyiotis, C.; Spandidos, D. A. and Sekeris, C. E. (1996): Mitochondrial genes as sites of primary action of steroid hormones, *Steroids* 61 [4], pp. 226-32. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8733006
- [118] Stirone, C.; Duckles, S. P.; Krause, D. N. and Procaccio, V. (2005): Estrogen increases mitochondrial efficiency and reduces oxidative stress in cerebral blood vessels, *Mol Pharmacol* 68 [4], pp. 959-65. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15994367
- [119] Barros, R. P.; Machado, U. F.; Warner, M. and Gustafsson, J. A. (2006): Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ERalpha, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 [5], pp. 1605-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16423895
- [120] Bryzgalova, G.; Gao, H.; Ahren, B.; Zierath, J. R.; Galuska, D.; Steiler, T. L.; Dahlman-Wright, K.; Nilsson, S.; Gustafsson, J. A.; Efendic, S. and Khan, A. (2006): Evidence that oestrogen receptor-alpha plays an important role in the regulation of glucose homeostasis in mice: insulin sensitivity in the liver, *Diabetologia* 49 [3], pp. 588-97. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16463047

- [121] Czubyrt, M. P. and Olson, E. N. (2004): Balancing contractility and energy production: the role of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) in cardiac hypertrophy, *Recent Prog Horm Res* 59, pp. 105-24. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14749499](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=14749499)
- [122] Jalil, J. E.; Doering, C. W.; Janicki, J. S.; Pick, R.; Shroff, S. G. and Weber, K. T. (1989): Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle, *Circ Res* 64 [6], pp. 1041-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2524288](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=2524288)
- [123] Cleutjens, J. P. (1996): The role of matrix metalloproteinases in heart disease, *Cardiovasc Res* 32 [5], pp. 816-21. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8944811](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8944811)
- [124] Bishop, J. E. and Lindahl, G. (1999): Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load, *Cardiovasc Res* 42 [1], pp. 27-44. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10434993](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10434993)
- [125] Laurent, G. J. (1987): Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass, *Am J Physiol* 252 [1 Pt 1], pp. C1-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3544859](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=3544859)
- [126] Kukacka, J.; Prusa, R.; Kotaska, K. and Pelouch, V. (2005): Matrix metalloproteinases and their function in myocardium, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 149 [2], pp. 225-36. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16601761](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16601761)
- [127] Gross, J. and Lapiere, C. M. (1962): Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay, *Proc Natl Acad Sci U S A* 48, pp. 1014-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=13902219](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=13902219)
- [128] Lamparter, S. and Maisch, B. (2000): [Significance of matrix metalloproteinases in cardiovascular diseases], *Z Kardiol* 89 [10], pp. 949-57. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11098546](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11098546)
- [129] Nagase, H. and Woessner, J. F., Jr. (1999): Matrix metalloproteinases, *J Biol Chem* 274 [31], pp. 21491-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10419448](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10419448)
- [130] Chakraborti, S.; Mandal, M.; Das, S.; Mandal, A. and Chakraborti, T. (2003): Regulation of matrix metalloproteinases: an overview, *Mol Cell Biochem* 253 [1-2], pp. 269-85. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14619979](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=14619979)
- [131] Walther, T.; Schubert, A.; Falk, V.; Binner, C.; Kanev, A.; Bleiziffer, S.; Walther, C.; Doll, N.; Autschbach, R. and Mohr, F. W. (2001): Regression of left ventricular hypertrophy after surgical therapy for aortic stenosis is associated with changes in extracellular matrix gene expression, *Circulation* 104 [12 Suppl 1], pp. I54-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11568030](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11568030)

- [132] Spinale, F. G.; Coker, M. L.; Heung, L. J.; Bond, B. R.; Gunasinghe, H. R.; Etoh, T.; Goldberg, A. T.; Zellner, J. L. and Crumbley, A. J. (2000): A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure, *Circulation* 102 [16], pp. 1944-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11034943](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11034943)
- [133] Hein, S.; Arnon, E.; Kostin, S.; Schonburg, M.; Elsasser, A.; Polyakova, V.; Bauer, E. P.; Klovekorn, W. P. and Schaper, J. (2003): Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms, *Circulation* 107 [7], pp. 984-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12600911](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12600911)
- [134] Peterson, J. T.; Hallak, H.; Johnson, L.; Li, H.; O'Brien, P. M.; Sliskovic, D. R.; Bocan, T. M.; Coker, M. L.; Etoh, T. and Spinale, F. G. (2001): Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure, *Circulation* 103 [18], pp. 2303-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11342481](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11342481)
- [135] Spinale, F. G.; Coker, M. L.; Thomas, C. V.; Walker, J. D.; Mukherjee, R. and Hebbbar, L. (1998): Time-dependent changes in matrix metalloproteinase activity and expression during the progression of congestive heart failure: relation to ventricular and myocyte function, *Circ Res* 82 [4], pp. 482-95. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9506709](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9506709)
- [136] Cleutjens, J. P.; Kandala, J. C.; Guarda, E.; Guntaka, R. V. and Weber, K. T. (1995): Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction, *J Mol Cell Cardiol* 27 [6], pp. 1281-92. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8531210](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8531210)
- [137] Levy, D.; Kenchaiah, S.; Larson, M. G.; Benjamin, E. J.; Kupka, M. J.; Ho, K. K.; Murabito, J. M. and Vasan, R. S. (2002): Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure, *N Engl J Med* 347 [18], pp. 1397-402. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12409541](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12409541)
- [138] Mejhert, M.; Kahan, T.; Edner, M. and Persson, H. E. (2008): Sex differences in systolic heart failure in the elderly: the prognostic importance of left ventricular mass in women, *J Womens Health (Larchmt)* 17 [3], pp. 373-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18338962](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18338962)
- [139] Cavasin, M. A.; Tao, Z.; Menon, S. and Yang, X. P. (2004): Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice, *Life Sci* 75 [18], pp. 2181-92. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15325844](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15325844)
- [140] Fang, L.; Gao, X. M.; Moore, X. L.; Kiriazis, H.; Su, Y.; Ming, Z.; Lim, Y. L.; Dart, A. M. and Du, X. J. (2007): Differences in inflammation, MMP activation and collagen damage account for gender difference in murine cardiac rupture following myocardial infarction, *J Mol Cell Cardiol* 43 [5], pp. 535-44. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17689559](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17689559)

-
- [141] Gao, X. M.; Xu, Q.; Kiriazis, H.; Dart, A. M. and Du, X. J. (2005): Mouse model of post-infarct ventricular rupture: time course, strain- and gender-dependency, tensile strength, and histopathology, *Cardiovasc Res* 65 [2], pp. 469-77. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15639486](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15639486)
- [142] Wang, F.; Keimig, T.; He, Q.; Ding, J.; Zhang, Z.; Pourabdollah-Nejad, S. and Yang, X. P. (2007): Augmented healing process in female mice with acute myocardial infarction, *Gen Med* 4 [3], pp. 230-47. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18022590](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18022590)
- [143] Xu, Y.; Arenas, I. A.; Armstrong, S. J. and Davidge, S. T. (2003): Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart, *Cardiovasc Res* 57 [2], pp. 388-94. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12566111](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12566111)
- [144] Dubey, R. K.; Gillespie, D. G.; Keller, P. J.; Imthurn, B.; Zacharia, L. C. and Jackson, E. K. (2002): Role of methoxyestradiols in the growth inhibitory effects of estradiol on human glomerular mesangial cells, *Hypertension* 39 [2 Pt 2], pp. 418-24. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11882583](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11882583)
- [145] Saraste, A. and Pulkki, K. (2000): Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis, *Cardiovasc Res* 45 [3], pp. 528-37. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10728374](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10728374)
- [146] Hengartner, M. O. (2000): The biochemistry of apoptosis, *Nature* 407 [6805], pp. 770-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11048727](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11048727)
- [147] Narula, J.; Hajjar, R. J. and Dec, G. W. (1998): Apoptosis in the failing heart, *Cardiol Clin* 16 [4], pp. 691-710, ix. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9891598](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9891598)
- [148] Narula, J.; Kharbanda, S. and Khaw, B. A. (1997): Apoptosis and the heart, *Chest* 112 [5], pp. 1358-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9367480](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9367480)
- [149] Narula, J.; Pandey, P.; Arbustini, E.; Haider, N.; Narula, N.; Kolodgie, F. D.; Dal Bello, B.; Semigran, M. J.; Bielsa-Masdeu, A.; Dec, G. W.; Israels, S.; Ballester, M.; Virmani, R.; Saxena, S. and Kharbanda, S. (1999): Apoptosis in heart failure: release of cytochrome c from mitochondria and activation of caspase-3 in human cardiomyopathy, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 [14], pp. 8144-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10393962](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10393962)
- [150] Olivetti, G.; Abbi, R.; Quaini, F.; Kajstura, J.; Cheng, W.; Nitahara, J. A.; Quaini, E.; Di Loreto, C.; Beltrami, C. A.; Krajewski, S.; Reed, J. C. and Anversa, P. (1997): Apoptosis in the failing human heart, *N Engl J Med* 336 [16], pp. 1131-41. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9099657](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9099657)
- [151] Anversa, P.; Olivetti, G.; Leri, A.; Liu, Y. and Kajstura, J. (1997): Myocyte cell death and ventricular remodeling, *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6 [2], pp. 169-76. URL:
-

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9146980
- [152] Condorelli, G.; Morisco, C.; Stassi, G.; Notte, A.; Farina, F.; Sgaramella, G.; de Rienzo, A.; Roncarati, R.; Trimarco, B. and Lembo, G. (1999): Increased cardiomyocyte apoptosis and changes in proapoptotic and antiapoptotic genes bax and bcl-2 during left ventricular adaptations to chronic pressure overload in the rat, *Circulation* 99 [23], pp. 3071-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10368127
- [153] Guerra, S.; Leri, A.; Wang, X.; Finato, N.; Di Loreto, C.; Beltrami, C. A.; Kajstura, J. and Anversa, P. (1999): Myocyte death in the failing human heart is gender dependent, *Circ Res* 85 [9], pp. 856-66. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10532954
- [154] Singer, J. B.; Hill, A. E.; Burrage, L. C.; Olszens, K. R.; Song, J.; Justice, M.; O'Brien, W. E.; Conti, D. V.; Witte, J. S.; Lander, E. S. and Nadeau, J. H. (2004): Genetic dissection of complex traits with chromosome substitution strains of mice, *Science* 304 [5669], pp. 445-8. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15031436
- [155] Dennis, G., Jr.; Sherman, B. T.; Hosack, D. A.; Yang, J.; Gao, W.; Lane, H. C. and Lempicki, R. A. (2003): DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery, *Genome Biol* 4 [5], p. P3. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12734009
- [156] Hosack, D. A.; Dennis, G., Jr.; Sherman, B. T.; Lane, H. C. and Lempicki, R. A. (2003): Identifying biological themes within lists of genes with EASE, *Genome Biol* 4 [10], p. R70. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=14519205
- [157] Ashburner, M.; Ball, C. A.; Blake, J. A.; Botstein, D.; Butler, H.; Cherry, J. M.; Davis, A. P.; Dolinski, K.; Dwight, S. S.; Eppig, J. T.; Harris, M. A.; Hill, D. P.; Issel-Tarver, L.; Kasarskis, A.; Lewis, S.; Matese, J. C.; Richardson, J. E.; Ringwald, M.; Rubin, G. M. and Sherlock, G. (2000): Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium, *Nat Genet* 25 [1], pp. 25-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10802651
- [158] Kregge, J. H.; Hodgins, J. B.; Couse, J. F.; Enmark, E.; Warner, M.; Mahler, J. F.; Sar, M.; Korach, K. S.; Gustafsson, J. A. and Smithies, O. (1998): Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 [26], pp. 15677-82. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9861029
- [159] Towbin, H.; Staehelin, T. and Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 [9], pp. 4350-4. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=388439
- [160] Takimoto, E.; Champion, H. C.; Li, M.; Belardi, D.; Ren, S.; Rodriguez, E. R.; Bedja, D.; Gabrielson, K. L.; Wang, Y. and Kass, D. A. (2005): Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy, *Nat Med* 11 [2], pp. 214-22. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15665834](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15665834)
- [161] Rockman, H. A.; Ross, R. S.; Harris, A. N.; Knowlton, K. U.; Steinhilber, M. E.; Field, L. J.; Ross, J., Jr. and Chien, K. R. (1991): Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 [18], pp. 8277-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=1832775](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=1832775)
- [162] Collins, K. A.; Korcarz, C. E. and Lang, R. M. (2003): Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice, *Physiol Genomics* 13 [3], pp. 227-39. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12746467](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12746467)
- [163] Korcarz, C. E.; Padrid, P. A.; Shroff, S. G.; Weinert, L. and Lang, R. M. (1997): Doppler echocardiographic reference values for healthy rhesus monkeys under ketamine hydrochloride sedation, *J Med Primatol* 26 [6], pp. 287-98. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9438222](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9438222)
- [164] Aurigemma, G. P.; Gaasch, W. H.; Villegas, B. and Meyer, T. E. (1995): Noninvasive assessment of left ventricular mass, chamber volume, and contractile function, *Curr Probl Cardiol* 20 [6], pp. 361-440. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7671634](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=7671634)
- [165] Tusher, V. G.; Tibshirani, R. and Chu, G. (2001): Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 [9], pp. 5116-21. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11309499](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11309499)
- [166] Brazma, A.; Hingamp, P.; Quackenbush, J.; Sherlock, G.; Spellman, P.; Stoeckert, C.; Aach, J.; Ansorge, W.; Ball, C. A.; Causton, H. C.; Gaasterland, T.; Glenisson, P.; Holstege, F. C.; Kim, I. F.; Markowitz, V.; Matese, J. C.; Parkinson, H.; Robinson, A.; Sarkans, U.; Schulze-Kremer, S.; Stewart, J.; Taylor, R.; Vilo, J. and Vingron, M. (2001): Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data, *Nat Genet* 29 [4], pp. 365-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11726920](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11726920)
- [167] Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 [5259], pp. 680-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=5432063](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=5432063)
- [168] Sambrook, J. and Gething, M. J. (1989): Protein structure. Chaperones, paperones, *Nature* 342 [6247], pp. 224-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2572969](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=2572969)
- [169] Ruskoaho, H. (2003): Cardiac hormones as diagnostic tools in heart failure, *Endocr Rev* 24 [3], pp. 341-56. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12788803](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12788803)
- [170] Vuolteenaho, O.; Ala-Kopsala, M. and Ruskoaho, H. (2005): BNP as a biomarker in heart disease, *Adv Clin Chem* 40, pp. 1-36. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16355919](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16355919)

- [171] Abassi, Z.; Karram, T.; Ellaham, S.; Winaver, J. and Hoffman, A. (2004): Implications of the natriuretic peptide system in the pathogenesis of heart failure: diagnostic and therapeutic importance, *Pharmacol Ther* 102 [3], pp. 223-41. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15246247](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15246247)
- [172] Nakao, K.; Minobe, W.; Roden, R.; Bristow, M. R. and Leinwand, L. A. (1997): Myosin heavy chain gene expression in human heart failure, *J Clin Invest* 100 [9], pp. 2362-70. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9410916](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9410916)
- [173] Reiser, P. J.; Portman, M. A.; Ning, X. H. and Schomisch Moravec, C. (2001): Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280 [4], pp. H1814-20. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11247796](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11247796)
- [174] Gupta, S.; Reutelingsperger, C. and Narula, J. (2005): Mortals turn me on, *J Nucl Med* 46 [6], pp. 906-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15937298](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15937298)
- [175] Pedram, A.; Razandi, M.; Aitkenhead, M. and Levin, E. R. (2005): Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro. Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIP1, *J Biol Chem* 280 [28], pp. 26339-48. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15899894](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15899894)
- [176] Satoh, M.; Matter, C. M.; Ogita, H.; Takeshita, K.; Wang, C. Y.; Dorn, G. W., 2nd and Liao, J. K. (2007): Inhibition of apoptosis-regulated signaling kinase-1 and prevention of congestive heart failure by estrogen, *Circulation* 115 [25], pp. 3197-204. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17562954](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17562954)
- [177] Witt, H.; Schubert, C.; Jaekel, J.; Fliegner, D.; Penkalla, A.; Tiemann, K.; Stypmann, J.; Roepcke, S.; Brokat, S.; Mahmoodzadeh, S.; Brozova, E.; Davidson, M. M.; Ruiz Noppinger, P.; Grohe, C. and Regitz-Zagrosek, V. (2008): Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice, *J Mol Med* 86 [9], pp. 1013-24. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18665344](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18665344)
- [178] Korte, T.; Fuchs, M.; Arkudas, A.; Geertz, S.; Meyer, R.; Gardiwal, A.; Klein, G.; Niehaus, M.; Krust, A.; Chambon, P.; Drexler, H.; Fink, K. and Grohe, C. (2005): Female mice lacking estrogen receptor beta display prolonged ventricular repolarization and reduced ventricular automaticity after myocardial infarction, *Circulation* 111 [18], pp. 2282-90. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15867180](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15867180)
- [179] Wagner, R. A.; Tabibiazar, R.; Powers, J.; Bernstein, D. and Quertermous, T. (2004): Genome-wide expression profiling of a cardiac pressure overload model identifies major metabolic and signaling pathway responses, *J Mol Cell Cardiol* 37 [6], pp. 1159-70. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15572046](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15572046)
- [180] Mirotsov, M.; Dzau, V. J.; Pratt, R. E. and Weinberg, E. O. (2006): Physiological genomics of cardiac disease: quantitative relationships between gene expression and left ventricular hypertrophy, *Physiol Genomics* 27 [1], pp. 86-94. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16835353](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16835353)
- [181] Weinberg, E. O.; Mirotsoy, M.; Gannon, J.; Dzau, V. J.; Lee, R. T. and Pratt, R. E. (2003): Sex dependence and temporal dependence of the left ventricular genomic response to pressure overload, *Physiol Genomics* 12 [2], pp. 113-27. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12454204](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12454204)
- [182] Haddad, G. E.; Saunders, L. J.; Crosby, S. D.; Carles, M.; del Monte, F.; King, K.; Bristow, M. R.; Spinale, F. G.; Macgillivray, T. E.; Semigran, M. J.; Dec, G. W.; Williams, S. A.; Hajjar, R. J. and Gwathmey, J. K. (2008): Human cardiac-specific cDNA array for idiopathic dilated cardiomyopathy: sex-related differences, *Physiol Genomics* 33 [2], pp. 267-77. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18303083](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18303083)
- [183] Liao, R.; Jain, M.; Cui, L.; D'Agostino, J.; Aiello, F.; Luptak, I.; Ngoy, S.; Mortensen, R. M. and Tian, R. (2002): Cardiac-specific overexpression of GLUT1 prevents the development of heart failure attributable to pressure overload in mice, *Circulation* 106 [16], pp. 2125-31. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12379584](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12379584)
- [184] Barp, J.; Araujo, A. S.; Fernandes, T. R.; Rigatto, K. V.; Llesuy, S.; Bello-Klein, A. and Singal, P. (2002): Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones, *Braz J Med Biol Res* 35 [9], pp. 1075-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12219179](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12219179)
- [185] Dantas, A. P.; Franco Mdo, C.; Silva-Antonialli, M. M.; Tostes, R. C.; Fortes, Z. B.; Nigro, D. and Carvalho, M. H. (2004): Gender differences in superoxide generation in microvessels of hypertensive rats: role of NAD(P)H-oxidase, *Cardiovasc Res* 61 [1], pp. 22-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14732198](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=14732198)
- [186] Lopaschuk, G. D.; Rebeyka, I. M. and Allard, M. F. (2002): Metabolic modulation: a means to mend a broken heart, *Circulation* 105 [2], pp. 140-2. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11790689](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11790689)
- [187] Barger, P. M.; Brandt, J. M.; Leone, T. C.; Weinheimer, C. J. and Kelly, D. P. (2000): Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor- α during cardiac hypertrophic growth, *J Clin Invest* 105 [12], pp. 1723-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10862787](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10862787)
- [188] Taegtmeyer, H.; Golfman, L.; Sharma, S.; Razeghi, P. and van Arsdall, M. (2004): Linking gene expression to function: metabolic flexibility in the normal and diseased heart, *Ann N Y Acad Sci* 1015, pp. 202-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15201161](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15201161)
- [189] Depre, C.; Vanoverschelde, J. L. and Taegtmeyer, H. (1999): Glucose for the heart, *Circulation* 99 [4], pp. 578-88. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9927407](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9927407)
- [190] Montessuit, C. and Thorburn, A. (1999): Transcriptional activation of the glucose transporter GLUT1 in ventricular cardiac myocytes by hypertrophic agonists, *J Biol Chem* 274 [13], pp. 9006-12. URL:

- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10085148
- [191] Razeghi, P.; Young, M. E.; Ying, J.; Depre, C.; Uray, I. P.; Kolesar, J.; Shipley, G. L.; Moravec, C. S.; Davies, P. J.; Frazier, O. H. and Taegtmeyer, H. (2002): Downregulation of metabolic gene expression in failing human heart before and after mechanical unloading, *Cardiology* 97 [4], pp. 203-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12145475
- [192] Abel, E. D. (2004): Insulin signaling in heart muscle: lessons from genetically engineered mouse models, *Curr Hypertens Rep* 6 [6], pp. 416-23. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15527684
- [193] Abel, E. D. (2004): Glucose transport in the heart, *Front Biosci* 9, pp. 201-15. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=14766360
- [194] Sharma, S.; Adroque, J. V.; Golfman, L.; Uray, I.; Lemm, J.; Youker, K.; Noon, G. P.; Frazier, O. H. and Taegtmeyer, H. (2004): Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart, *Faseb J* 18 [14], pp. 1692-700. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15522914
- [195] Taegtmeyer, H. (2004): Cardiac metabolism as a target for the treatment of heart failure, *Circulation* 110 [8], pp. 894-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15326079
- [196] Rizzo, G. and Fiorucci, S. (2006): PPARs and other nuclear receptors in inflammation, *Curr Opin Pharmacol* 6 [4], pp. 421-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16777482
- [197] Schiffrin, E. L. (2005): Peroxisome proliferator-activated receptors and cardiovascular remodeling, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288 [3], pp. H1037-43. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15374828
- [198] Smeets, P. J.; Planavila, A.; van der Vusse, G. J. and van Bilsen, M. (2007): Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation: take it to heart, *Acta Physiol (Oxf)* 191 [3], pp. 171-88. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17935522
- [199] Smeets, P. J.; Teunissen, B. E.; Planavila, A.; de Vogel-van den Bosch, H.; Willemsen, P. H.; van der Vusse, G. J. and van Bilsen, M. (2008): Inflammatory pathways are activated during cardiomyocyte hypertrophy and attenuated by PPARalpha and PPARdelta, *J Biol Chem*. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18701451
- [200] Delerive, P.; Fruchart, J. C. and Staels, B. (2001): Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control, *J Endocrinol* 169 [3], pp. 453-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11375115
- [201] Jalouli, M.; Carlsson, L.; Ameen, C.; Linden, D.; Ljungberg, A.; Michalik, L.; Eden, S.; Wahli, W. and Oscarsson, J. (2003): Sex difference in hepatic peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression: influence of pituitary and gonadal

- hormones, Endocrinology 144 [1], pp. 101-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12488335
- [202] Simpkins, J. W.; Yang, S. H.; Sarkar, S. N. and Pearce, V. (2008): Estrogen actions on mitochondria--physiological and pathological implications, Mol Cell Endocrinol 290 [1-2], pp. 51-9. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18571833
- [203] Villari, B.; Campbell, S. E.; Hess, O. M.; Mall, G.; Vassalli, G.; Weber, K. T. and Kraysenbuehl, H. P. (1993): Influence of collagen network on left ventricular systolic and diastolic function in aortic valve disease, J Am Coll Cardiol 22 [5], pp. 1477-84. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8227808
- [204] Hess, O. M.; Villari, B. and Kraysenbuehl, H. P. (1993): Diastolic dysfunction in aortic stenosis, Circulation 87 [5 Suppl], pp. IV73-6. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8485837
- [205] Lorell, B. H. and Grossman, W. (1987): Cardiac hypertrophy: the consequences for diastole, J Am Coll Cardiol 9 [5], pp. 1189-93. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2952703
- [206] **Ehrenberg, Nadine Geschlechterunterschiede beim kardialen Remodeling der extrazellulären Matrix durch Laufradtraining und Myokardinfarkt im Mausmodell, Dissertationsarbeit, Dissertation**
- [207] Hess, O. M.; Schneider, J.; Koch, R.; Bamert, C.; Grimm, J. and Kraysenbuehl, H. P. (1981): Diastolic function and myocardial structure in patients with myocardial hypertrophy. Special reference to normalized viscoelastic data, Circulation 63 [2], pp. 360-71. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=6450003
- [208] Spinale, F. G. (2007): Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function, Physiol Rev 87 [4], pp. 1285-342. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17928585
- [209] Hamacher, S.; Matern, S. and Roeb, E. (2004): [Extracellular matrix -- from basic research to clinical significance. An overview with special consideration of matrix metalloproteinases], Dtsch Med Wochenschr 129 [38], pp. 1976-80. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15375740
- [210] Kuster, G. M.; Kotlyar, E.; Rude, M. K.; Siwik, D. A.; Liao, R.; Colucci, W. S. and Sam, F. (2005): Mineralocorticoid receptor inhibition ameliorates the transition to myocardial failure and decreases oxidative stress and inflammation in mice with chronic pressure overload, Circulation 111 [4], pp. 420-7. URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15687129
- [211] Heymans, S.; Schroen, B.; Vermeersch, P.; Milting, H.; Gao, F.; Kassner, A.; Gillijns, H.; Herijgers, P.; Flameng, W.; Carmeliet, P.; Van de Werf, F.; Pinto, Y. M. and Janssens, S. (2005): Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart, Circulation 112 [8], pp. 1136-44. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16103240](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16103240)
- [212] Fielitz, J.; Philipp, S.; Herda, L. R.; Schuch, E.; Pilz, B.; Schubert, C.; Gunzler, V.; Willenbrock, R. and Regitz-Zagrosek, V. (2007): Inhibition of prolyl 4-hydroxylase prevents left ventricular remodelling in rats with thoracic aortic banding, *Eur J Heart Fail* 9 [4], pp. 336-42. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17145199](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17145199)
- [213] Battle, M.; Perez-Villa, F.; Garcia-Pras, E.; Lazaro, A.; Orus, J.; Roque, M. and Roig, E. (2007): Down-regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in the myocardium of congestive heart failure patients, *Transplant Proc* 39 [7], pp. 2344-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17889183](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17889183)
- [214] Patten, R. D.; Pourati, I.; Aronovitz, M. J.; Baur, J.; Celestin, F.; Chen, X.; Michael, A.; Haq, S.; Nuedling, S.; Grohe, C.; Force, T.; Mendelsohn, M. E. and Karas, R. H. (2004): 17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis in vivo and in vitro via activation of phospho-inositide-3 kinase/Akt signaling, *Circ Res* 95 [7], pp. 692-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15345655](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15345655)
- [215] Olivetti, G.; Giordano, G.; Corradi, D.; Melissari, M.; Lagrasta, C.; Gambert, S. R. and Anversa, P. (1995): Gender differences and aging: effects on the human heart, *J Am Coll Cardiol* 26 [4], pp. 1068-79. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7560601](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=7560601)
- [216] Lygate, C. A.; Schneider, J. E.; Hulbert, K.; ten Hove, M.; Sebag-Montefiore, L. M.; Cassidy, P. J.; Clarke, K. and Neubauer, S. (2006): Serial high resolution 3D-MRI after aortic banding in mice: band internalization is a source of variability in the hypertrophic response, *Basic Res Cardiol* 101 [1], pp. 8-16. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16132171](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16132171)
- [217] Takimoto, E. and Kass, D. A. (2007): Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling, *Hypertension* 49 [2], pp. 241-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17190878](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17190878)

Publikationsliste

Fliegner D., Schubert C., Penkalla A., Kintscher U., Gustafsson J.A., Regitz-Zagrosek V. Beneficial effects of female sex and estrogen receptor β in the hypertrophic response to pressure overload; in preparation

Fliegner D., Westermann D, Riad A, Schubert C, Becher E, Fielitz J, , Tschöpe C, Regitz-Zagrosek V. "Upregulation of PPAR γ in myocardial infarction", Eur J Heart Fail. 2008 Jan; 10(1): 30-8

Witt H, Schubert C, Jaekel J, **Fliegner D.**, Penkalla A, Tiemann K, Stypmann J, Roepcke S, Brokat S, Mahmoodzadeh S, Brozova E, Ruiz Noppinger P, Grohé C, Regitz-Zagrosek V. "Sex-Specific Pathways in Early Cardiac Response to Pressure Overload in Mice" J Mol Med 2008 Sep;86(9):1013-24

Pop O, Westermann M, Volkmer-Engert R, **Schulz D.**, Lemke C, Schreiber S, Gerlach R, Wetzker R, Müller JP. „Sequence-specific binding of prePhoD to soluble TatAd indicates protein-mediated targeting of the Tat export in Bacillus subtilis. J Biol Chem. 2003 Oct 3; 278(40):38428-36".

Kongressbeiträge-Poster und Vorträge

Fliegner D., Schubert C., Penkalla A., Kintscher U., Gustafsson J.A., Regitz-Zagrosek V. Hypertrophic response to pressure overload and transition to heart failure differ in female and male mice. Posterbeitrag Keystone Symposia, Copper Mountain, Januar 2008

Fliegner D., Schubert C., Penkalla A., Kintscher U., Gustafsson J.A., Regitz-Zagrosek V. Hypertrophic response to pressure overload and transition to heart failure differ in female and male mice. Posterbeitrag Day of Science 2007

Fliegner D., Schubert C., Penkalla A., Kintscher U., Gustafsson J.A., Regitz-Zagrosek V. Hypertrophic response to pressure overload and transition to heart failure differ in female and male mice. Posterbeitrag GiM Oktober 2007

Fliegner D., Schubert C., Penkalla A., Kintscher U., Gustafsson J.A., Regitz-Zagrosek V. Keystone Symposia, Steamboat Springs 04/2007

Fliegner D., Schubert C., Penkalla A., Kintscher U., Gustafsson J.A., Regitz-Zagrosek V. Gender differences and influence of estrogen receptor beta on the cardiac response to pressure overload in mice. Posterbeitrag; ACC, New Orleans 03/2007

Fliegner D, Westermann D, Riad A, Schubert C, Becher E, Fielitz J, , Tschöpe C, Regitz-Zagrosek, Regulation of PPARs and PPAR target genes myocardial infarction in rats. Posterbeitrag; ESC; Hamburg 2007

Fliegner D., Regulation of PPARs and PPAR target genes in an experimental myocardial infarction rat model. Vortrag, Day of Science 2006,

Fliegner D., Schubert C., Penkalla A., Kintscher U., Gustafsson J.A., Regitz-Zagrosek V. „Gender differences and influence of estrogen receptor beta on the cardiac response to pressure overload in mice”, Posterbeitrag ECCR-Meeting 2006, Nizza

Fliegner D., Penkalla A., Kintscher U., Gustafsson J.A., Regitz-Zagrosek V. „Gender differences and influence of estrogen receptor beta on the cardiac response to pressure overload induced hypertrophy”, Posterbeitrag GiM-Meeting 2006, Berlin

Fliegner D, Becher E, Riad A, Schubert C, Tschöpe C, Regitz-Zagrosek V. Upregulation of PPAR γ in an experimental myocardial infarction rat model does not lead to upregulation of PPAR γ metabolic target genes. Hypertension 2005;46: 888-916; Posterbeitrag ECCR Meeting

Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Vera Regitz- Zagrosek für eine umfassende und sehr gute Betreuung und für die Vergabe des Themas. Weiterhin bedanke ich mich für Ihre stete Diskussionsbereitschaft, für den anregenden gedanklichen Austausch, der mir sehr geholfen hat meine Ergebnisse kritisch zu hinterfragen und für die Möglichkeit an zahlreichen wissenschaftlichen Kongressen teilnehmen zu dürfen.

Ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Carola Schubert für die direkte wissenschaftliche Betreuung der Doktorarbeit und für den wissenschaftlichen Austausch, den wir fast zu jeder Tageszeit und Weltzeit führten. Danke, dass Du „labortechnisch fast für alle Schandtaten“ bereit warst und mich und meine Arbeit unterstützt hast.

Eva Becher, Eva Brozova, Adam, Chris, George und insbesondere Anja danke ich für die stimulierende Arbeitsatmosphäre und für den steten Gedankenaustausch. Sie standen mir immer mit Rat und Tat zur Seite und haben mich oft zum Lachen gebracht. Großer Dank an Anja, Jenny, Britta und Sandra für die tolle Unterstützung im Laboralltag. Allen anderen Mitgliedern der AG Regitz- Zagrosek danke ich für eine kollegiale Zusammenarbeit.

Meinen Kooperationspartner Hennig Witt aus der Arbeitsgruppe Ruiz danke ich für die statistische Analyse der Mikroarray-Daten. Durch ihn bin ich in die Welt der Mikroarrays getaucht, die mich immer wieder neue Schätze und Untergründe finden lassen.

Einen herzlichen Dank und Gruß an die Herren aus Steglitz: Bei Alexander Riad und Dirk Westermann aus der Arbeitsgruppe Tschöpe möchte ich mich für das Vermitteln der tierexperimentellen Techniken und die stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich stets darin bestärkten, meinen Weg zu gehen und mich in allen Höhen und Tiefen meines Lebens mit ihrer Geduld und Liebe unterstützt haben. Meinen Freunden danke ich für die bedingungslose Hilfe und für Gespräche in allen Lebenslagen.

Mein besonderer Dank gilt Vinzent, der mir Kraft und Ruhe gegeben hat, mich stets mit seinem allumfassenden Wissen, seiner Geduld und Liebe unterstützt hat und mich mit all meinen Launen während dieser Zeit ertragen hat und mir dennoch immer ein herzliches Lachen entgegen bringen konnte.

„ Wenn es einen Glauben gibt, der Berge versetzen kann, dann ist es der Glaube an die eigene Kraft.“

Marie von Ebner- Eschenbach, 1830 - 1916,
-österreichische Schriftstellerin –

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Daniela Fliegner, dass die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig von mir verfasst wurde und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet, und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter erstellt wurde.

Berlin, 30.08.08

Daniela Fliegner